

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Pavčina Jursová

Expresce lncRNA MIAT v nádorových buňkách
lncRNA MIAT expression in cancer cells

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Praha, 2021

Poděkování

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, CSc. za vedení mé bakalářské práce a trpělivost. Zároveň bych chtěla poděkovat Mgr. *et* Ing. Barbaře Feriančikové za pomoc s realizací mé laboratorní práce a její neskutečnou ochotu.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. 4. 2021

Podpis

Abstrakt

V mnoha případech bylo prokázáno, že lncRNA jsou významnými regulátory genové exprese a tudíž jsou často zapojeny do různých biologických funkcí a patologických procesů včetně nádorového onemocnění. MIAT (*myocardial infarction associated transcript*) je jednou z dlouhých nekódujících RNA, která byla poprvé identifikována v roce 2006 a původně izolována jako hlavní gen zapojující se do infarktu myokardu. Tato lncRNA se významně zapojuje do vývoje několika dalších onemocnění jako je například diabetická retinopatie, schizofrenie či mikrovaskulární dysfunkce. Ovšem MIAT byla identifikována také v mnoha maligních nádorech jako karcinogenní regulátor. Několik studií již publikovalo, že umlčením MIAT lze docílit snížení buněčné životaschopnosti, proliferace a schopnosti invaze a současně podpořit buněčnou senescenci a apoptózu nádorových buněk. Proto je považována za potenciální biomarker a terapeutický cíl u nádorových onemocnění. MIAT se zapojuje do buněčných procesů různými mechanismy. Je schopna regulovat alternativní sestřih, genovou expresi či fungovat mechanismem ceRNA a ovlivňovat tak biologické procesy související se vznikem nádorů. Součástí této práce bylo i vyšetření relativní exprese MIAT v buněčných liniích Ewingova sarkomu, kde byla zjištěna vyšší exprese.

Klíčová slova

MIAT, lncRNA, nádorové onemocnění, Ewingův sarkom, tumorigeneze, ceRNA, miRNA

Abstract

LncRNAs have been shown, in many cases, to function as important regulators for gene expression and thus, they can play a critical role in various biological functions and disease processes including cancer. Myocardial infarction associated transcript (MIAT) is one of the non-coding RNAs first identified as lncRNA in 2006 and originally isolated as a candidate gene for myocardial infarction. This long non-coding RNA is also involved in other diseases such as diabetic retinopathy, paranoid schizophrenia or microvascular dysfunction. MIAT has also been identified as a carcinogenic regulator in many malignant tumors. Numerous researches have reported that MIAT silencing reduces cell viability, proliferation and invasivity and enhances cellular senescence and apoptosis of cancer cells. Therefore, it is considered a potential biomarker and therapeutic target in cancer. MIAT is involved in cellular processes through various mechanisms. It regulates alternative splicing, gene expression or functions through ceRNA mechanism and thus influences biological processes related to the tumor formation. Furthermore, in this study have been found that relative expression of MIAT was increased in Ewing sarcoma cell lines.

Key words

MIAT, lncRNA, cancer, Ewing sarcoma, tumorigenesis, ceRNA, miRNA

Obsah

1) Úvod.....	9
2) Mechanismy regulace dlouhých nekódujících RNA.....	10
2.1) cis-působící lncRNA	10
2.2) trans-působící lncRNA.....	11
2.3) Asociace lncRNA s nádorovými onemocněními	13
3) Dlouhá nekódující RNA MIAT	13
3.1) Význam lncRNA MIAT u různých typů onemocnění	15
3.2) Mechanismy regulace pomocí MIAT	16
3.3) Význam MIAT u nádorových onemocnění.....	17
3.3.1) Hepatocelulární karcinom	17
3.3.2) Karcinom žaludku	19
3.3.3) Karcinom prsu.....	20
3.3.4) Nádor vaječníku	22
3.3.5) Nádor plic.....	23
3.3.6) Kolořektální karcinom	25
3.3.7) Karcinom štítné žlázy.....	25
3.3.8) Další typy nádorového onemocnění.....	26
3.4) Shrnutí a diskuze	27
4) Stanovení exprese MIAT v buněčných liniích Ewingova sarkomu.....	29
4.1.) Materiál a chemikálie	30
4.2) Metody	31
4.2.1) Kultivace buněčných linií	31
4.2.2) Izolace RNA z analyzovaných buněk Ewingova sarkomu	31
4.2.3) Reverzní transkripce RNA	32
4.2.4) Kvantitativní polymerázová reakce v reálném čase (RT-qPCR) pro gen MIAT	32
4.3) Výsledky	33
5) Závěr	33
Literatura:	35

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-FU	5-fluorouracil
Airn	<i>z ang. antisense of IGF2R non-protein coding RNA</i>
AKT	proteinkináza B
APs	apikální progenitor (neuronů)
BBP	<i>z ang. branch point binding protein</i>
BC	karcinom prsu
BCOR	<i>z ang. BCL6 Corepressor</i>
BPs	basální progenitor (neuronů)
CC	karcinom děložního hrdla
cDNA	komplementární DNA
ceRNA	kompetitivní endogenní RNA
CLL	chronická lymfocytární leukémie
c-Met	<i>z ang. c-mesenchymal-epithelial transition factor</i>
c-Myb	<i>z ang. MYB proto-oncogene, transcription factor</i>
c-Myc	<i>z ang. MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>
CRC	kolorektální karcinom
DDX5	<i>z ang. DEAD-box RNA helicase 5</i>
DISC1	<i>z ang. disrupted in schizophrenia</i>
Dnmt3a	DNA (cytosin-5)-metyltransferáza 3A
DUSP7	fosfatáza 7 s dvojí specificitou
EOC	epitelový nádor vaječníku
ER	endoplasmatické retikulum
ERBB4	<i>z ang. v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogen homolog 4</i>
EWS	Ewingův sarkom
EZH2	<i>z ang. enhancer of zeste homolog 2</i>
GC	karcinom žaludku
GRP78	glukózou regulovaný protein 78
H3	histon H3
H3K27me3	<i>z ang. histone H3 lysin 27 trimethylation</i>
H4	histon H4
HCC	hepatocelulární karcinom
HDAC4	histon-deacetyláza 4
hiPSC	<i>z ang. human-induced pluripotent stem cells</i>

HOTAIR	<i>z ang. HOX transcript antisense RNA</i>
HOX	homeobox
Kb	<i>z ang. kilobase</i>
Kbp	<i>z ang. kilobase pair</i>
LASP1	<i>z ang. LIM and SH3 domain protein 1</i>
lncRNA	dlouhá nekódující RNA
Loxl2	<i>z ang. lysyl oxidase-like 2</i>
LSCC	laryngální spinocelulární karcinom
LSD1	lysin-specifická demetyláza 1
Malat1	<i>z ang. metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1</i>
MAP3K12	mitogenem aktivovaná proteinkináza 12
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy
MI	infarkt myokardu
MIAT	<i>z ang. myocardial infarction-associated transcript</i>
miRNA	mikroRNA
MLL	<i>z ang. mixed-lineage leukemia</i>
MM	mnohočetný myelom
MMP-9	<i>z ang. matrix metalloproteinase-9</i>
mRNA	messengerRNA
mTOR	<i>z ang. mammalian target of rapamycin</i>
NBL	neuroblastom
ncRNA	nekódující RNA
NMYC	<i>z ang. MYCN proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>
NORAD	<i>z ang. noncoding RNA activated by DNA damage</i>
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic
OCT4	<i>z ang. octamer-binding transcription factor 4</i>
ORF	otevřený čtecí rámec
PCNA	<i>z ang. proliferating cell nuclear antigen</i>
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PRC2	<i>z ang. polycomb repressive komplex 2</i>
pre-mRNA	nascentní (nesestřižená) mRNA
PTC	karcinom štítné žlázy
PUM1/2	PUMILIO proteiny 1 a 2
RNAi	RNA interference

RNP	ribonukleový komplex
RT-qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
S100A7	<i>z ang. S100 calcium-binding protein A7</i>
SASP	<i>z ang. senescence-associated secretory phenotype</i>
SF1	sestříhový faktor 1
SGK1	<i>z ang. serum/glucocorticoid regulated kinase 1</i>
siRNA	krátká interferující RNA
SIRT1	sirtuin 1
Slug	<i>z ang. snail family transcriptional repressor 2 (SNAIL2)</i>
sncRNA	krátká nekódující RNA
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
TAZ	<i>z ang. transcriptional co-activator with PDZ-binding motif</i>
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α
TSCC	spinocelulární karcinom jazyka
UTR	nepřekládaná oblast
VEGF	vaskulární endotelový faktor
Wnt	<i>z ang. wingless/int-1</i>
Wnt7b	<i>z ang. wnt family member 7B</i>
Wnt9a	<i>z ang. wnt family member 9A</i>
Xist	<i>z ang. X-inactive specific transcript</i>
ZEB1	<i>z ang. zinc finger E-box binding homeobox 1</i>

1) Úvod

Je prokázáno, že cca tři čtvrtiny eukaryotického genomu jsou transkripčně aktivní, přičemž pouze méně než 2% lidského genomu tvoří protein-kódující geny (Djebali *et al.*, 2012). Z toho vyplývá, že eukaryotické buňky jsou producenty značného množství nekódujících¹ RNA molekul (ncRNA). Kompletní seznam těchto RNA zatím není znám. Nejdřív se předpokládalo, že nemají žádnou funkci a jsou jen „odpadním produktem“, ale čím dál více se odkrývá skutečnost, že ncRNA regulují genovou expresi na transkripční i posttranskripční úrovni a tím zasahují do regulace většiny buněčných procesů. Změny jejich exprese a pravděpodobně i jejich mutace mají vážné dopady na fenotyp (Aznaourova *et al.*, 2020). Řada experimentálních i klinických studií prokázala zapojení ncRNA do patogeneze mnoha onemocnění, od metabolických poruch přes onemocnění orgánových systémů až po různé typy nádorů.

Nekódující RNA molekuly klasifikujeme na krátké nekódující RNA (sncRNA) a dlouhé nekódující RNA (lncRNA). Krátké ncRNA jsou mezidruhově konzervované a patří mezi ně např. miRNA, siRNA a další. Dlouhé ncRNA už tak konzervované nejsou a jsou zatím méně prozkoumanou skupinou těchto ncRNA. Objev a studium dlouhých nekódujících RNA molekul jsou velmi významné pro biologii člověka a pochopení některých lidských nemocí, jelikož představují rozsáhlou, do značné míry neprozkoumanou, a především funkční složku genomu. Zároveň mohou mít využití i v diagnostice některých onemocnění, a to na základě změny jejich exprese asociované například s nádory, a v současnosti se také spekuluje o léčbě cílené na tyto ncRNA (Brunner *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2019; Portoso *et al.*, 2017).

LncRNA lze obecně definovat jako transkripty o délce více než 200 nukleotidů, které nejsou následně translatovány do proteinů. Tvoří velmi rozmanitou skupinu enhancerů RNA, intergenových transkriptů a sense či antisense transkriptů překrývající jiné geny (Derrien *et al.*, 2012). Do této skupiny patří také ncRNA MIAT - *myocardial infarction associated transcript*, které je věnována tato bakalářská práce.

Cílem této bakalářské práce je poukázat na důležitost lncRNA v lidském genomu, speciálně na lncRNA MIAT a objasnit její význam u různých chorob zvláště u nádorových onemocnění. V neposlední řadě je tato bakalářská práce obohacena o experimentální práci zabývající se expresí lncRNA MIAT v buňkách Ewingova sarkomu.

¹ RNA molekuly, které nekódují žádný peptid ani protein

V první kapitole se věnuji dlouhým nekódujícím RNA obecně. Na několika příkladech je ukázáno, jakým způsobem mohou různé lncRNA regulovat buněčné a molekulární procesy. Cílem této kapitoly je seznámit s jejich mechanismy a demonstrovat, že lncRNA nejsou „odpadním produktem genomu“ jak se původně soudilo, ale že jsou významné pro řadu buněčných funkcí a jejich studium je přínosem i pro diagnostiku a léčbu řady chorob.

Druhá kapitola se věnuje samotné lncRNA MIAT, která se významně zapojuje do patogeneze několika onemocnění včetně mikrovaskulární dysfunkce či schizofrenie. Také jsou zde popsány některé mechanismy, kterými MIAT reguluje genovou expresi a alternativní sestřih. Cílem této kapitoly je nastínit význam MIAT v patogenezi několika onemocnění.

Další část této kapitoly pojednává o zapojení lncRNA MIAT do vývoje a progresu několika typů nádorového onemocnění. Jsou zde popsány i konkrétní mechanismy a zároveň uvedeny související informace k některým jiným regulačním molekulám, které přímo „spolupracují“ s MIAT a tudíž se spolupodílí na konečné regulaci.

Poslední kapitola je věnována experimentální práci, kdy byla stanovována relativní exprese MIAT v buněčných liniích Ewingova sarkomu.

2) Mechanismy regulace dlouhých nekódujících RNA

Dlouhé nekódující molekuly RNA lze klasifikovat do dvou základních skupin dle jejich způsobu regulace a to na cis-působící a trans-působící. Cis-působící lncRNA ovlivňují geny v bezprostřední blízkosti svého vlastního lokusu, tedy místa na DNA, odkud je lncRNA transkribována. Naproti tomu trans-působící molekuly lncRNA ovlivňují geny podstatně vzdálenější od místa, kde je lokalizován gen, který je kóduje (Ulitsky and Bartel, 2013)².

2.1) cis-působící lncRNA

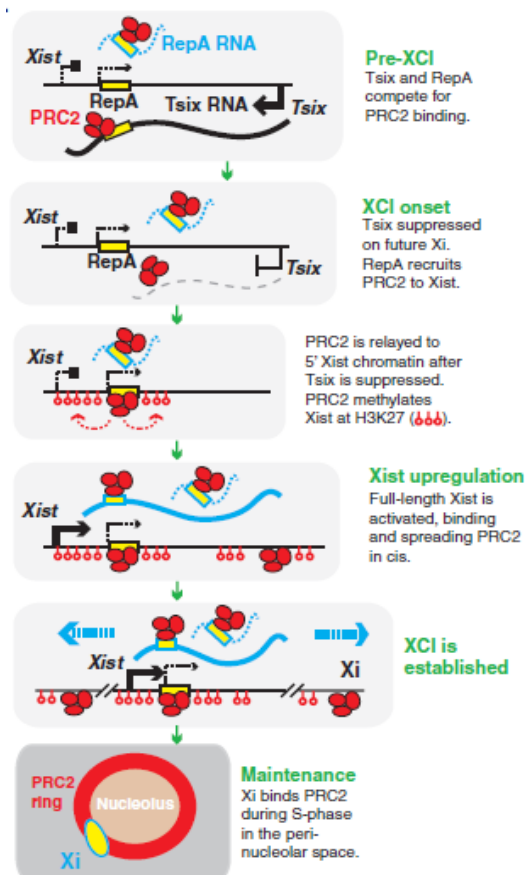
U cis-působících lncRNA je občas obtížné prokázat, zda se jedná skutečně o funkci samotné lncRNA. Jako první příklad lncRNA, jejíž funkcí je lokální regulace chromatinu či genové exprese, lze uvést lncRNA Xist. Xist se podílí na inaktivaci X chromosomu u samic v časném embryonálním vývoji. Transkripce Xist probíhá pouze z jednoho X chromosomu, který se později stane neaktivním (Xi). Po indukci se Xist šíří po celém Xi a iniciuje události vedoucí k přesměrování chromozomu na jadernou periferii, označení represivními chromatinovými značkami a transkripčnímu umlčení téměř celého chromozomu (Penny *et al.*, 1996). Xist asociuje s PRC2 (*polycomb repressive complex 2*) prostřednictvím její strukturní

² Ulitsky and Bartel, 2013 je přehledový článek

domény (*Repeat A*) (Obr. 1). PRC2 má histon metyltransferázovou aktivitu, což vede k umístění histonové značky H3K27me3 (*histone H3 lysin 27 trimethylation*) na inaktivující se X chromosom (Zhao *et al.*, 2008). Jedním z mechanismů, kterým lncRNA regulují expresi sousedních genů, je jejich schopnost rekrutovat regulační faktory právě do lokusu těch sousedních genů a tím měnit jejich expresi.

Je ovšem také možné, že regulace genové exprese pomocí lncRNA vůbec nezávisí na sekvenci dané lncRNA. Například *imprinting* (umlčení) genu *Igf2r* vyžaduje pouze transkripční překrytí jeho promotoru dlouhou nekódující antisense RNA *Airn* (Latos *et al.*, 2012). Lze říci, že tento způsob regulace genové exprese je závislý pouze na procesu transkripce či sestřihu lncRNA.

Dále je možné, že lokální regulace genové exprese je uskutečněná díky běžným cis-působícím DNA elementům, které jsou zabudovány do těla genu lncRNA a její sekvence ani proces transkripce zde nehrajou žádnou roli (Engreitz *et al.*, 2016).



Obr. 1: Model mechanismu regulace pomocí Xist (převzato z Zhao *et al.*, 2008)

2.2) trans-působící lncRNA

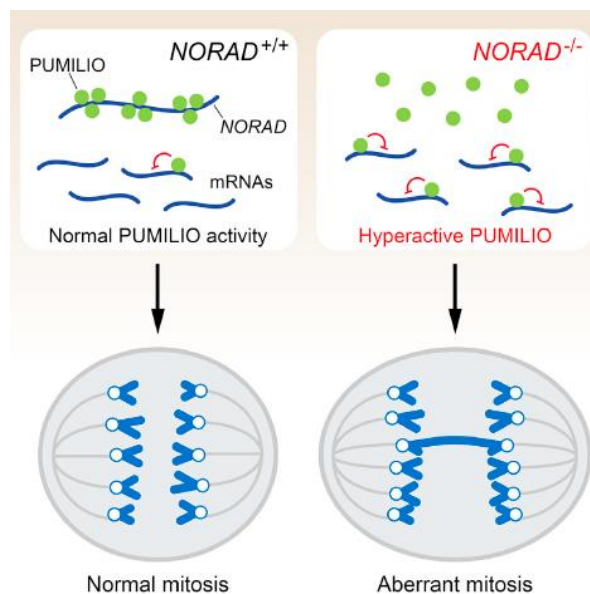
Těchto dlouhých nekódujících RNA je nespočet. Do skupinky trans-působících lncRNA ovlivňujících stav chromatinu a genovou expresi lze zařadit například dlouhou ncRNA HOTAIR. Rinn *et al.* (2007) se zabývali transkriptomem HOX lokusů a zjistili, že HOTAIR se transkribuje z HOXC lokusu. Pomocí RNA interference snížili množství HOTAIR v buněčné linii. Úbytek lncRNA HOTAIR měl sice i menší vliv na transkripci HOXC lokusu umístěného na chromosomu 12, ale hlavně toto snížení množství HOTAIR vedlo k výrazné transkripční aktivitě HOXD lokusu na chromosomu 2 vzdáleného více než 40kbp (*kilobase pair*) od místa transkripce HOTAIR. Z těchto pozorování vyplývá, že je HOTAIR zodpovědná za transkripční umlčování chromatinové domény HOXD lokusu, a že je trans-působící (působí na dálku). Dále zjistili, že HOTAIR buď přímo či nepřímo asociuje s komplexem PRC2 (s tímto komplexem asociuje i cis-působící Xist viz výše)

a ztráta této interakce vede ke snížení schopnosti PRC2 methylovat konce histonů a schopnosti umlčet HOXD lokus. Nicméně HOTAIR je schopna interagovat jak s metylázou, tak zároveň i s demethylázou. PRC2 komplex (methyláza) se váže na 5'konec HOTAIR a na 3'konec se váže LSD1 komplex (demethyláza). Schopnost vázat oba komplexy umožňuje HOTAIR lépe modifikovat stav chromatinu (Tsai *et al.*, 2010).

Dalším příkladem trans-působící lncRNA je transkript Malat1 (*metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*), která je distribuována v jaderných skvrnách (Tripathi *et al.*, 2010), tedy v místech, kde pravděpodobně dochází k sestřihu a podílí se na organizaci jádra. Tato lncRNA specificky interaguje s nascentními mRNA (tedy s pre-mRNA) prostřednictvím proteinových intermediátů (Engreitz *et al.*, 2014). Engreitz *et al.* uvádí, že Malat1 nejsilněji interaguje s těmi transkripty pre-mRNA, které jsou později sestřihávány tzv. alternativně, tedy do mnoha různých mRNA, včetně mRNA kódujících RNA-vazebné proteiny. Také zjistili, že s interakcemi mezi Malat1 a pre-mRNA souvisí její umístění v genomu. Jinými slovy, k lokalizaci Malat1 na chromatin dochází prostřednictvím jejích interakcí s pre-mRNA na velkém množství aktivních genových lokusů, což naznačuje, že Malat1 ovlivňuje RNA processing. Nicméně o konkrétních mechanismech působení kolem Malat1 je toho stále mnoho neznámého.

Některé lncRNA naopak specificky „vychytávají“ například proteiny s vlastní regulační funkcí a tak nepřímo regulují některý z buněčných procesů. Takovou RNA je třeba NORAD (*noncoding RNA activated by DNA damage*). RNA NORAD má několik domén, na které se vážou RNA-vazebné proteiny PUM1 a PUM2 ze skupiny PUMILIO. Pomocí svých domén a těchto proteinů je NORAD schopná sestavit cytoplazmatický ribonukleoproteinový (RNP) komplex. Funguje tedy jako negativní

regulátor proteinů PUM1/2 a omezuje jejich interakce s cílovými mRNA. Hyperaktivita PUMILIO proteinů, způsobená vyřazením RNA NORAD z funkce, vede k aneuploidii v jinak karyotypicky zdravých buňkách (Obr. 2) (Lee *et al.*, 2016).



Obr. 2: Funkce RNA NORAD (převzato z Lee *et al.*, 2016)

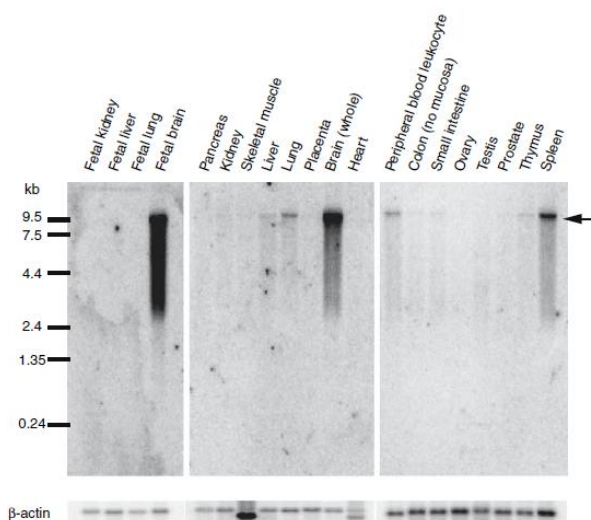
2.3) Asociace lncRNA s nádorovými onemocněními

Mnoho lncRNA má důležité regulační funkce na úrovni genové exprese, transkripce a jiných biologických procesů. Zdá se, že spousta z nich vykazuje i klíčové role ve změnách těchto procesů u nádorových onemocnění (Calin *et al.*, 2007). Dle analýzy, kterou provedli Brunner *et al.* (2012), by mohly lncRNA sloužit jako potenciální biomarkery pro odhalení časných stádií některých nádorů. Tato studie ukazuje změněnou expresi mnoha lncRNA u řady solidních nádorů ve srovnání s jejich expresí v odpovídajících tkáních nenádorových. Ačkoli průměrná exprese lncRNA byla vyšší v nádorových tkáních, většina lncRNA vykazovala expresi i v normálních tkáních. Tudiž se dostáváme k závěru, že mnoho těchto transkriptů má funkční role v normálních tkáních a jejich exprese přetrvává v odpovídajících nádorových onemocněních. Některé transkripty také vykazovaly vysokou tkáňovou specifitu.

Například již zmíněná lncRNA Malat1 je jedním z transkriptů, jejíž expresí lze předpovědět tvorbu metastáz v časném stádiu nemalobuněčného karcinomu plic (*non-small cell lung cancer - NSCLC*), a lze ho tak včas diagnostikovat a zahájit příslušnou léčbu (Ji *et al.*, 2003). Také RNA HOTAIR je jedna z prvních RNA, o nichž se uvádí, že podporují rozvoj nádorového onemocnění (Rinn *et al.*, 2007).

Zdá se, že nadměrná regulace pomocí některých dlouhých nekódujících RNA molekul může snadno vyústit v nádorové bujení a tvorbě metastáz. Tento předpoklad má velký význam pro onkologii a je třeba lncRNA studovat, mohly by totiž představovat možnost zlepšení diagnostiky a také mohou posloužit jako terapeutický cíl.

3) Dlouhá nekódující RNA MIAT



Obr. 3: Exprese MIAT v několika tkáních (převzato z Ishii *et al.*, 2006)

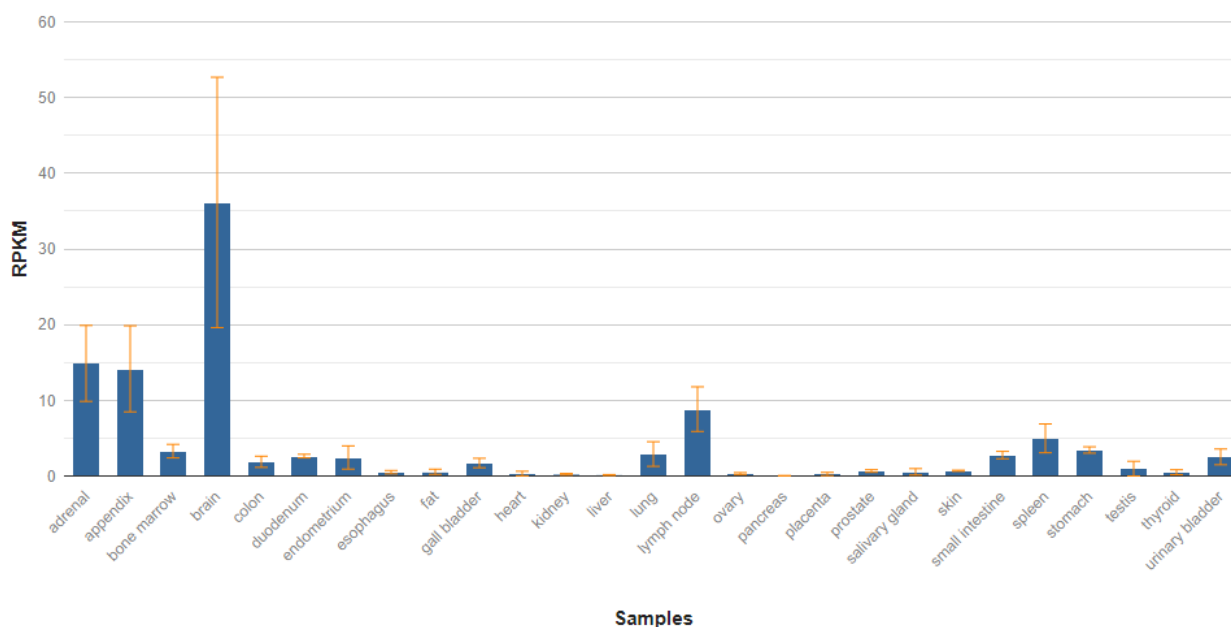
Na počátku identifikace RNA MIAT stojí studie z roku 2006 (Ishii *et al.*, 2006). Tato studie se zabývala tzv. jednonukleotidovými polymorfismy (SNPs) v souvislosti s infarktem myokardu (MI). Nejdříve se jim podařilo identifikovat jeden SNP v genu FLJ25967 na chromozomu 22q12.1, který vykazoval významně vysokou asociaci s MI. Dále vyšetřili expresi tohoto genu v několika tkáních Northernblotem. Detekovali cca 10 kb

dlouhý transkript ve slezině, leukocytech periferní krvi, plicích, játrech, brzlíku a v tlustém i tenkém střevě. Největší míra exprese však byla detekována v mozku (Obr. 3). V cDNA tohoto transkriptu nenašli žádný dlouhý otevřený čtecí rámec (ORF) kódující protein. Došli k závěru, že se jedná o gen kódující funkční RNA a označili ji jako MIAT, *myocardial infarction associated transcript*.

Dlouhá nekódující RNA MIAT, též známá pod názvy Gomafu či RNCR2, je asociována především s MI. Avšak má význam v mnoha dalších onemocněních. Stejný gen u myši byl asociován s determinací „osudu“ buněk sítnice (Rapicavoli *et al.*, 2010). Zároveň Rapicavoli *et al.* (2010) vyšetřovali gen MIAT i u dalších obratlovců a zjistili, že obsahuje velmi konzervované sekvence.

Lidský gen MIAT je lokalizován na chromozomu 22q12.1 a nativní RNA je sestřihávána do čtyř variant (Ishii *et al.*, 2006). I přesto, že má podobný charakter jako mRNA (polyadenylace či sestřih), většinou uniká jadernému exportu a akumuluje se v jaderné matrix, kde reguluje genovou expresi (Sone *et al.*, 2007). Nicméně lze ji nalézt také v cytoplasmě, kde působí především jako ceRNA (Yan *et al.*, 2015)

Expresí MIAT je tkáňově specifická. Nejvíce byla detekována v mozku a v nadledvinách (Graf 1)³ (Fagerberg *et al.*, 2014; Ishii *et al.*, 2006).



Graf 1: Expresí lncRNA MIAT ve zdravých lidských tkáních (dostupný na NCBI Gene Bank)

³ Graf je vygenerován z práce Fagerberg *et al.*, 2014 a je dostupný v databázi NCBI na adrese <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/440823>

3.1) Význam lncRNA MIAT u různých typů onemocnění

MIAT je významně spjata s kardiovaskulárními nemocemi, především s infarktem myokardu (Ishii *et al.*, 2006). Její míra exprese koreluje s příznaky srdečních onemocnění a je ovlivněna kardiovaskulárními rizikovými faktory, např. kouřením. Její exprese je také spojena s prognózou MI (Vausort *et al.*, 2014). Dle této studie, pacienti se známkou akutního infarktu myokardu (tzv. s elevací „ST“ segmentu EKG křivky) měli vyšší hladiny MIAT než pacienti bez elevace segmentu.

Nejde opominout ani spojitost mezi MIAT a mikrovaskulární dysfunkcí. Yan *et al.* (2015) zdůrazňují zapojení lncRNA MIAT do patologické angiogeneze (procesu novotvorby krevních kapilár). Jako cílové onemocnění této studie si vybrali diabetickou retinopatii, což je mikrovaskulární komplikace diabetu mellitus. Prokázali zvýšenou expresi lncRNA MIAT v diabetických sítnicích. MIAT byla konstitutivně exprimována v několika buňkách sítnice a byla lokalizována především v jádrech. Na endoteliálních buňkách a buňkách sítnice prokázali, že vysoká hladina glukózy indukuje expresi MIAT. Knockdown MIAT vedl ke snížení nadměrné regulace kaspázy-3 a také ke zvýšení množství fosforylované serin/treoninové AKT kinázy. Výsledkem bylo snížení apoptotických buněk v hyperglykemické sítnici. Knockdown MIAT také snížil nadměrnou regulaci proteinů VEGF, TNF- α a intracelulární adhezivní molekuly-1 a tím se zmírnil zánět sítnice a novotvorba cév za diabetických podmínek. V neposlední řadě downregulace MIAT významně snížila proliferaci a migraci endoteliálních buněk *in vitro*. Lze říci, že se lncRNA MIAT ukázala jako kritický regulátor funkce endoteliálních buněk *in vitro* a zároveň její knockdown zjevně zlepšil mikrovaskulární dysfunkci sítnice indukovanou diabetem mellitus *in vivo* (Yan *et al.*, 2015).

Fakt, že lncRNA MIAT je ve značném množství exprimována také v mozku (Ishii *et al.*, 2006) nebo například v gangliových buňkách sítnice (Sone *et al.*, 2007) naznačuje její význam ve vývoji neuronů či v rozvoji některých duševních chorob. Sone *et al.* (2007) prokázali expresi lncRNA MIAT již v diferencujících se progenitorových buňkách, přičemž její exprese pokračovala v konkrétních typech postmitotických neuronů.

Ukázalo se, že lncRNA MIAT hraje na úrovni vývoje mozkové tkáně důležité role. Má vliv například na generování basálních progenitorů neuronů (BPs) z apikálních progenitorů (APs) a dále ovlivňuje jejich přechod z proliferativního dělení na neurogení dělení. V neposlední řadě se podílí na přežívání „novorozených“ neuronů (Apra *et al.*, 2013).

Není tedy divu, že se MIAT uplatňuje i u některých duševních chorob. Barry *et al.* (2014) zjišťovali, zda je lncRNA MIAT zapojena do regulace alternativního sestřihu genů

DISC1 (*disrupted in schizophrenia*) a ERBB4 (*v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogen homolog 4*), které jsou spojeny s patogenezí schizofrenie. Zkusili zvýšit míru exprese MIAT v nervových buňkách odvozených od hiPSC (*human-induced pluripotent stem cells*), což vyústilo k významnému snížení exprese jak DISC1, tak ERBB4 a jejich alternativně sestříhaných variant. Naopak knockdown MIAT vedl ke zvýšení množství sestříhaných variant těchto genů, ale zároveň nezvýšil množství neseestříhaných transkriptů. Dále porovnávali hladiny exprese MIAT v mozkové tkáni pacientů se schizofrenií a nepostižených jedinců. Zjistili, že v posmrtné kortikální tkáni pacientů se schizofrenií byla míra exprese MIAT 1,75krát snížena ve srovnání s kontrolní skupinou. Tyto informace podporují roli lncRNA MIAT v patogenezi schizofrenie.

LncRNA MIAT má svou roli i v mechanismech vyvolávajících úzkostné stavy (Spadaro *et al.*, 2015). Tato studie naznačuje, že knockdown MIAT v mediálním prefrontálním kortexu podporuje chování, které se podílí na vývoji úzkostných poruch.

3.2) Mechanismy regulace pomocí MIAT

LncRNA MIAT je schopná regulovat *splicing* (sestřih) některých molekul. O molekulární podstatě tohoto způsobu regulace pojednává studie z roku 2011 (Tsuiji *et al.*, 2011). Na evolučně vzdáleném kuřecím homologu MIAT se jim podařilo zjistit, že gen MIAT obsahuje mnoho tandemových repetice TACTAAC. Přičemž RNA sekvence této repetice UACUAAC se shoduje se striktně konzervovanou konsensus sekvencí místa větvení (*branch point sequence*) intronu a je nezbytná například pro vystřížení intronu v rodících se kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* (Langford *et al.*, 1984). Na tuto sekvenci se pevně váže protein BBP (*branch point binding protein*), což je zároveň prvním krokem sestřihu (Berglund *et al.*, 1997). Tsuiji *et al.* (2011) zjistili, že savčí homolog proteinu BBP, SF1 (*splicing factor 1*), interaguje se sekvencí UACUAAC v lncRNA MIAT. Navíc tato sekvence v MIAT se váže na protein SF1 s vyšší afinitou než savčí konsensus sekvence místa větvení intronu v pre-mRNA a byla tak schopna inhibovat sestřih modelového substrátu *in vitro* (Tsuiji *et al.*, 2011).

MIAT zprostředkovává například alternativní splicing determinantů buněčného „osudu“ během neurogeneze (Apra *et al.*, 2013). V této studii identifikovali jeden faktor podílející se na vývoji mozku - Wnt7b. Nadměrná exprese MIAT či pozdější downregulace MIAT pomocí RNAi zapříčinila změnu podílu sestřihu varianty Wnt7b-201 ku sestřihu varianty Wnt7b-202. Je to vůbec první ověření úlohy MIAT při splicingu *in vivo*. Jak už bylo

řečeno výše, MIAT také reguluje sestřih pre-mRNA proteinů DISC1 a ERBB4, které jsou spojovány s patogenezí schizofrenie (Barry *et al.*, 2014).

Zároveň se objevují studie, které prokazují, že MIAT funguje rovněž jako kompetitivní endogenní RNA (ceRNA) pro některé miRNA. To znamená, že obsahuje homologní sekvenci k miRNA a funguje tedy jako falešný cíl dané miRNA, kterou tím vyřazuje z funkce a brání jí v regulaci její původní cílové molekuly. Yan *et al.* (2015) jsou jedni z prvních, kteří demonstrovali, že regulační aktivita miRNA (v tomto případě miR-150-5p) je přímo cílená na RNA MIAT. Pomocí negativní regulace miR-150-5p byla MIAT schopna zvýšit expresi proteinu VEGF a podpořit tak angiogenezi u mikrovaskulární dysfunkce. To, že je MIAT schopna fungovat jako ceRNA a inhibovat tak různé miRNA má velký význam především v tumorigenezi, neboť tento způsob regulace je stěžejním mechanismem, kterým se MIAT zapojuje do vývoje nádorových onemocnění.

3.3) Význam MIAT u nádorových onemocnění

Mnoho studií již potvrdilo zapojení lncRNA MIAT do vývoje nádorového onemocnění (Crea *et al.*, 2016; Sattari *et al.*, 2016)⁴. Fakt, že je MIAT regulační molekulou, která se podílí i na regulaci buněčného cyklu naznačuje, že má svou roli rovněž v regulaci buněčné proliferace (Yan *et al.*, 2015). Zároveň MIAT reguluje alternativní sestřih (viz výše) a ten je producentem mnoha onkogenů či tumor-supresorů (Klinck *et al.*, 2008). Tudíž lze předpokládat významné zapojení lncRNA MIAT do tumorigeneze.

Následující kapitoly budou pojednávat o významu a funkci dlouhé nekódující RNA MIAT v několika typech nádorového onemocnění.

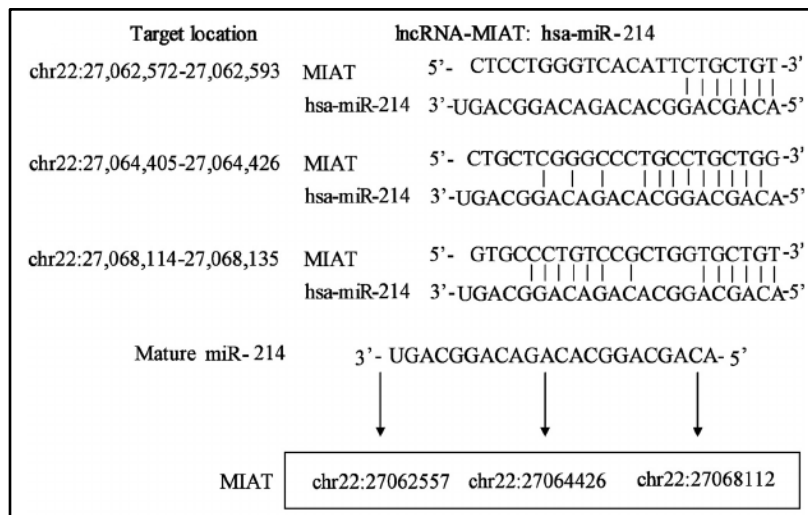
3.3.1) Hepatocelulární karcinom

Hepatocelulární karcinom (HCC) je jedním z primárních maligních nádorů jater. Bylo prokázáno, že lncRNA MIAT přímo váže miR-214 a tím reguluje její expresi v HCC (Huang *et al.*, 2018), přičemž tato miRNA je důležitým supresorem HCC (Yang *et al.*, 2015). Huang *et al.* (2018) dále zjišťovali hlavní roli MIAT v souvislosti s miR-214 v nádorových buňkách. Expresí MIAT byla signifikantně vyšší v nádorových tkáních a HCC buněčných liniích v porovnání se zdravými jaterními buňkami. Další jejich výzkum ukázal, že míra acetylace histonů H3 a H4 v místě promotoru genu MIAT u HCC tkání byla významně vyšší než

⁴ Crea *et al.*, 2016 je přehledový článek

u odpovídajících tkání nenádorových, což vysvětluje její vyšší expresi v HCC tkáních a buňkách.

Dále zjistili, že exprese MIAT negativně koreluje s expresí miR-214 a tudíž by spolu mohly interagovat (Obr. 4). Po knockdownu MIAT se zesílila exprese miR-214 v HCC



Obr. 4: Schéma vazebného místa MIAT a miR-214 (převzato z Huang *et al.*, 2018)

buněčných liniích. Zároveň knockdown MIAT způsobil downregulaci proteinů EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*) a β -kateninu, což jsou downstream cíle miR-214 (Xia *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015). Díky downregulaci těchto proteinů byla inhibována invazivita HCC buněk a také snížena jejich

životaschopnost, z čehož vyplývá že lncRNA MIAT podporuje invazivitu a životaschopnost HCC buněk pomocí negativní regulace miR-214 (Huang *et al.*, 2018).

Jiná studie se zaměřila na funkci MIAT v buněčné senescenci⁵ a tumorigenezi v HCC (Zhao *et al.*, 2019). Umlčení genu MIAT inhibovalo proliferaci buněk HCC a podpořilo buněčnou senescenci HCC. Také zjistili negativní korelaci mezi expresí MIAT a miR-22-3p. Další pozorování ukázalo, že tato miRNA je esenciální pro udržení fenotypu senescence a také tumor-inhibujícího efektu, který byl vyvolán předešlou downregulací MIAT v HCC buňkách. Dále se jim podařilo zjistit, že přímým cílem miR-22-3p je protein SIRT1⁶, který, jak ukázal jejich pozdější výzkum, hraje klíčovou roli v potlačování senescence a podporuje tumorigenezi v HCC. Knockdown MIAT inhiboval expresi SIRT1, přičemž tento efekt byl dále posílen nadměrnou expresí miR-22-3p v buňkách HCC. MIAT tedy upreguluje expresi SIRT1, tím že kompetitivně váže miR-22-3p a SIRT1 tudíž nemůže být degradován.

Zhao *et al.* (2019) se dále zaměřili na roli MIAT v aktivaci tumor-supresorové signální dráhy p53/p21 a p16/pRb. Výsledky ukázaly, že knockdown MIAT významně zvýšil expresi mRNA a proteinů p53, p21, p16 a pRb. Downregulace MIAT tedy narušila rovnováhu mezi MIAT, miR-22-3p a SIRT1 a indukovala buněčnou senescenci, což ve výsledku vyústilo v aktivaci signální dráhy p53/p21 a p16/pRb a zároveň v sekreci prozánětlivých faktorů SASP

⁵ Tzv. replikativní stárnutí, které posléze vede k zastavení buněčného cyklu

⁶ SIRT1 patří do rodiny proteinů histon-deacetyláz (HDACs), třída III (sirtuiny)

(*senescence-associated secretory phenotype*). To vše nakonec vedlo k inhibici buněčné proliferace a tumorigeneze v HCC buňkách.

3.3.2) Karcinom žaludku

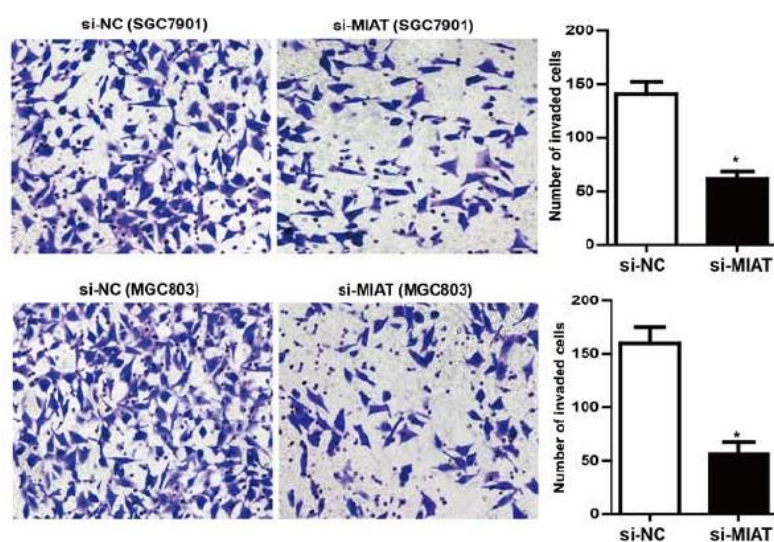
Karcinom žaludku (*gastric cancer - GC*) je nádorové onemocnění epitelu žaludku, které je v současnosti velmi častou příčinou úmrtí na rakovinu v Evropě. Li *et al.*, (2017) potvrdili vyšší expresi MIAT v tkáních pacientů s karcinomem žaludku a v nádorových buněčných liniích ve srovnání se zdravými tkáněmi a nenádorovými buňkami. Také zjistili, že MIAT obsahuje potenciální miRNA-vazebné místo pro miR-29a-3p. Downregulace MIAT pomocí siRNA v tkáních a buněčných liniích karcinomu žaludku významně zvýšila expresi miR-29a-3p ve srovnání s kontrolami. Další jejich výsledky ukázaly, že knockdown MIAT snížil proliferaci a indukoval apoptózu buněk GC a také downregulace MIAT bránila buňkám

GC v migraci a invazivitě (Obr. 5). Dále potvrdili, že miR-29a-3p obsahuje vazebné místo pro 3'UTR mRNA HDAC4 (*histone deacetylase 4*). Tento protein patří do skupiny enzymů HDACs a zařazuje se do třídy II (do stejné skupiny enzymů patří i SIRT1 viz hepatocelulární karcinom). HDAC4 by mohl být zodpovědný za abnormální

biologické „chování“ buněk GC, jelikož jiné studie již dříve prokázaly zapojení HDACs do vývoje některých nádorů (Mottet *et al.*, 2009).

Li *et al.* (2017) vyšetřili profil exprese HDAC4 v tkáních a buněčných liniích GC a potvrdili větší množství mRNA a proteinů HDAC4 v buňkách a tkáních karcinomu žaludku. Na základě těchto poznatků došli k závěru, že MIAT funguje jako kompetitivní endogenní RNA pro miR-29a-3p, čímž ji inhibuje a to vede k vzrůstu míry exprese HDAC4 v buňkách GC a nakonec k abnormálnímu „chování“ buněk karcinomu žaludku. Ale to, jak přesně HDAC4 způsobuje tyto procesy není zatím jasné a je potřeba dalšího výzkumu.

Kromě vazebného místa pro miR-29a-3p obsahuje MIAT také vazebné místo pro miR-141 (Sha *et al.*, 2018). Nadměrná exprese této miRNA (indukovaná downregulací MIAT)



Obr. 5: Snížení schopnosti invaze buněk GC (SGC7901 a MGC803) po downregulaci MIAT ve srovnání s negativními kontrolami (převzato z Li *et al.*, 2017)

v buňkách karcinomu žaludku inhibuje proliferaci buněk GC a zabraňuje tvorbě metastáz, zatímco její umlčení podporuje růst GC *in vitro* a *in vivo*. Jedním z cílů miR-141 je protein TAZ (*transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*) (Zuo *et al.*, 2015). MIAT tedy pozitivně reguluje expresi TAZ prostřednictvím miR-141 a nadměrná exprese proteinu TAZ v tkáních GC podporuje epitel-mezenchymální tranzici buněk GC (Ge *et al.*, 2017). Při epitel-mezenchymální tranzici dochází ke změně epiteliálního fenotypu buňky v mezenchymální. V průběhu toho se mění tvar buňky, která ztrácí svoji polaritu a závislost na buněčných spojích a je schopnější vycestovat z buněčné kolonie, čímž se zvyšuje i její schopnost metastazovat (Matějka *et al.*, 2017)⁷.

Sha *et al.* (2018) dále zjistili, že MIAT zřejmě podporuje GC růst a tvorbu metastáz tím, že reguluje miR-141/DDX5 dráhu. Vysoká exprese DDX5 (*DEAD-box RNA helicase 5*) je asociována s již pokročilým stádiem GC a navíc nadměrná exprese DDX5 stimuluje buněčný růst a buněčnou proliferaci GC prostřednictvím mTOR (*mammalian target of rapamycin*) signalizační dráhy (Du *et al.*, 2017).

LncRNA MIAT tedy brání v regulaci původních cílů miR-29a-3p a miR-141 a tím nepřímo reguluje jiné regulační molekuly podílejících se na vývoji karcinomu žaludku.

3.3.3) Karcinom prsu

Karcinom prsu (*breast cancer* - BC) je nejčastější zhoubný nádor u žen a i zde uplatňuje svou regulační funkci RNA MIAT. Luan *et al.* (2017) prokázali vyšší expresi MIAT v buněčných liniích a tkáních karcinomu prsu. Zároveň knockdown MIAT v těchto buňkách inhiboval buněčnou proliferaci a stimuloval apoptózu a to i při expozici buněk UV-C záření či jejich inkubaci s cytostatiky (Almnaseer and Mourtada-Maarabouni, 2018). Downregulace MIAT dále inhibovala jejich migraci a invazivitu a také inhibovala buněčný růst *in vivo* (Luan *et al.*, 2017).

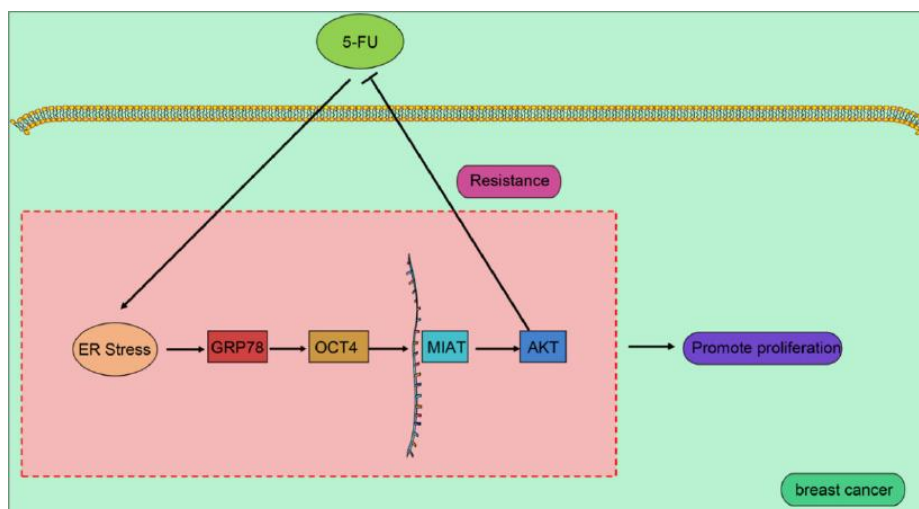
Inhibice MIAT navíc spouští buněčnou senescenci v buňkách BC (Alipoor *et al.*, 2018). Alipoor *et al.* (2018) zároveň vyšetřili míru exprese genů zapojujících se do buněčné proliferace včetně cyklinu D1 a PCNA a zjistili, že jejich exprese se značně snížila při umlčení MIAT. Naopak při downregulaci MIAT se značně zvýšila exprese některých miRNA a to včetně miR-302 jejímž cílem je například cyklin D1 (Hou *et al.*, 2019). Možným mechanismem je, že MIAT reguluje expresi cyklinu D1 prostřednictvím této miRNA. Alipoor *et al.* (2018) dále analyzovali distribuci buněčného cyklu buněk karcinomu prsu. Výsledky ukázaly, že knockdown MIAT způsobil zvýšení počtu buněk ve fázi G1 buněčného cyklu

⁷ Matějka *et al.*, 2017 je přehledový článek

a současné snížení počtu buněk ve fázi G2/M. Tato data ukazují, že MIAT může být zapojena do tumorigeneze BC prostřednictvím regulace buněčného cyklu. To, že se MIAT zapojuje do vývoje BC potvrzují i Almnaseer a Mourtada-Maarabouni (2018), kteří prokázali, že míra exprese MIAT je značně zvýšena především v časných stádiích BC. Také se ukázalo, že exprese MIAT pozitivně koreluje s expresí OCT4 (*octamer-binding transcription factor 4*), což je transkripční faktor, který je schopen regulovat expresi MIAT (Sattari *et al.*, 2016). Zdá se ovšem, že tato regulace je oboustranná. Downregulací MIAT lze snížit hladiny mRNA OCT4 (Almnaseer and Mourtada-Maarabouni, 2018). Potlačení exprese OCT4 následně vede k aktivaci inhibitoru cyklin-dependentních kináz, p21. Aktivní p21 pak působí jako tumorsupresor blokující buněčný cyklus (Wang *et al.*, 2013).

Nedávno bylo zjištěno, že se lncRNA MIAT společně s OCT4 zapojuje do regulační dráhy způsobující rezistenci vůči 5-fluorouracilu (5-FU) u buněk karcinomu prsu (Obr. 6) (Yao *et al.*, 2020). 5-FU je antimetabolit inhibující thymidinsyntázu (Vinod *et al.*, 2013) a je jedním z nejběžněji používaných protinádorových chemoterapeutik. Yao *et al.* (2020) zjistili,

že stres endoplasmatického retikula (ER) způsobuje rezistenci buněk BC vůči 5-FU přes GRP78/OCT4/MIAT/AKT regulační dráhu. Protein GRP78 je známý marker ER stresu

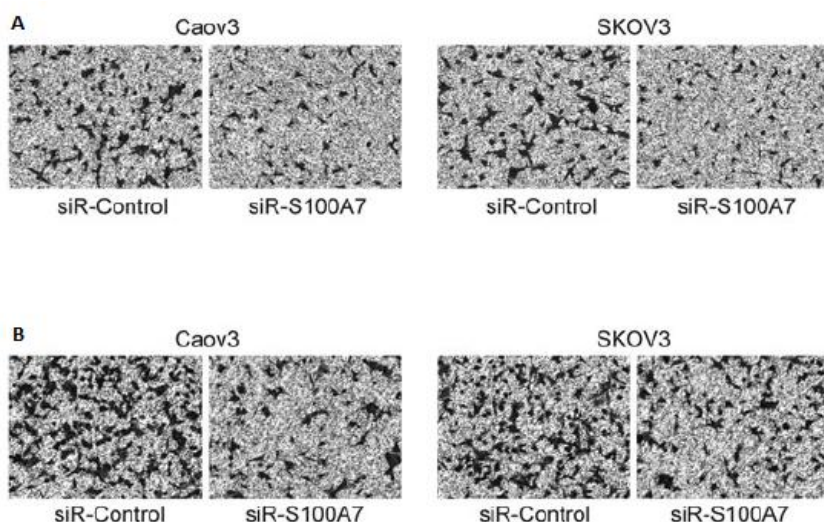


Obr. 6: Znázornění vzniku rezistence buněk BC vůči 5-FU (převzato z Yao *et al.*, 2020)

a jeho exprese byla značně zvýšena v buňkách BC resistantních vůči 5-FU oproti nerezistentním buněčným liniím BC. Jejich výsledky ukázaly, že 5-FU podpořil ER stres v BC, čímž se zvýšila exprese GRP78. Zvýšená exprese GRP78 měla za následek i zvýšenou expresi OCT4, který pozitivně reguluje lncRNA MIAT. Zvýšená exprese MIAT vedla ke zvýšení exprese AKT a, jak již dříve naznačili Luo *et al.* (2018), signální dráha AKT zprostředkovává rezistenci proti lékům v BC.

3.3.4) Nádor vaječníku

Nejčastější typ ovariálního nádoru je epitelový (*epithelial ovarian cancer - EOC*). Mitra *et al.* (2017) detekovali lncRNA MIAT v karcinomu vaječníku jako lncRNA asociovanou s epitel-mezenchymální tranzicí. O rok později jiná studie potvrdila vyšší expresi MIAT v buňkách EOC oproti buňkám nenádorovým. Zároveň downregulace MIAT v tkáních karcinomu vaječníku inhibovala buněčnou proliferaci a indukovala apoptózu (Shao *et al.*, 2018). Shao *et al.* (2018) navíc prokázali, že MIAT váže miR-330-5p v buňkách EOC. Přímým cílem této miRNA je například protein S100A7 (*S100 calcium-binding protein A7*) (Lin *et al.*, 2018). S100A7 se zapojuje do regulace mnoha buněčných procesů včetně regulace buněčné proliferace u nádorových buněk (Qi *et al.*, 2015) nebo regulace MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) signální dráhy (Dey *et al.*, 2016). Lin *et al.* (2018) dále našli, že knockdown S100A7 snižuje buněčnou proliferaci, migraci a invazivitu v tkáních EOC



Obr. 7: Potlačení migrace (A) a invazivity (B) buněk EOC (Caov3 a SKOV3) po knockdownu S100A7 ve srovnání s kontrolami (převzato z Lin *et al.*, 2018)

(Obr. 7). Navíc zjistili, že protein S100A7 se podílí na vytvoření rezistence buněk EOC vůči cisplatině⁸. Tyto poznatky tedy naznačují, že MIAT v karcinomu vaječníku podporuje buněčný růst, chemorezistenci a tumorigenezi částečně regulací exprese S100A7

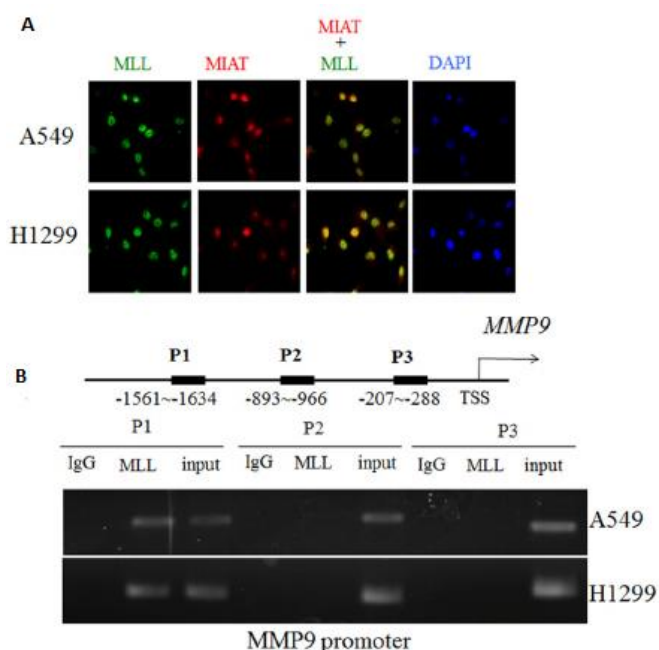
prostřednictvím miR-330-5p.

Kromě již zmíněného, MIAT obsahuje vazebné místo také pro miR-150-5p (Yan *et al.*, 2015). MiR-150-5p je tumor-supresorový gen cílící na různé mRNA jako například MAP3K12 v karcinomu prostaty (Yu *et al.*, 2018). Nedávná studie prokázala, že MIAT reguluje buněčnou migraci, invazivitu a epitel-mezenchymální tranzici v karcinomu vaječníku též prostřednictvím regulace exprese miR-150-5p (Zhou *et al.*, 2020).

⁸ Cytostatikum používané u EOC i řady dalších zhoubných nádorů

3.3.5) Nádor plic

Nemalobuněčný karcinom plic (*non-small-cell lung cancer - NSCLC*) je jeden ze dvou typů bronchogenního karcinomu. U tohoto typu nádoru byla zjištěna vyšší míra exprese lncRNA MIAT ve srovnání s odpovídající tkání nenádorovou. Současně nadměrná exprese MIAT v NSCLC byla asociována s pokročilými stádii a množství MIAT v buňkách také korelovalo s velikostí nádoru (Lai *et al.*, 2017). Další výsledky ukázaly, že knockdown MIAT oslabil buněčnou proliferaci a zpomalil přechod buněk z G1 fáze buněčného cyklu do S fáze. Dále umlčení MIAT snížilo migraci a invazivitu buněk NSCLC *in vitro* a *in vivo*. Také si



Obr. 8: (A) Lokalizace MIAT a MLL převážně v jádře. (B) Znárodnění vazebné oblasti promotoru MMP-9 s MLL – MLL se váže na oblast P1 promotoru MMP-9. (převzato z Lai *et al.*, 2017)

všimli, že míra exprese MIAT pozitivně koreluje s expresí proteinu MMP-9 (*matrix metalloproteinase-9*). MMP-9 se zapojuje do tumorigeneze u jiných typů nádorových onemocnění (Ramos-DeSimone *et al.*, 1999) a lze tedy předpokládat, že by mohl mít význam i v NSCLC. Lai *et al.* (2017) prokázali přímou interakci mezi MIAT a modulátory histonů rodiny MLLs (Obr. 8), které se řadí mezi hlavní aktivátory genové exprese. Tato interakce byla nezbytná pro MLL k regulaci aktivity MMP-9 prostřednictvím epigenetické změny. Z dosavadních poznatků tedy

vyplývá, že MIAT zprostředkovává buněčnou migraci, invazivitu a vznik metastáz prostřednictvím aktivace MMP-9 díky interakci s genovými aktivátory skupiny MLLs.

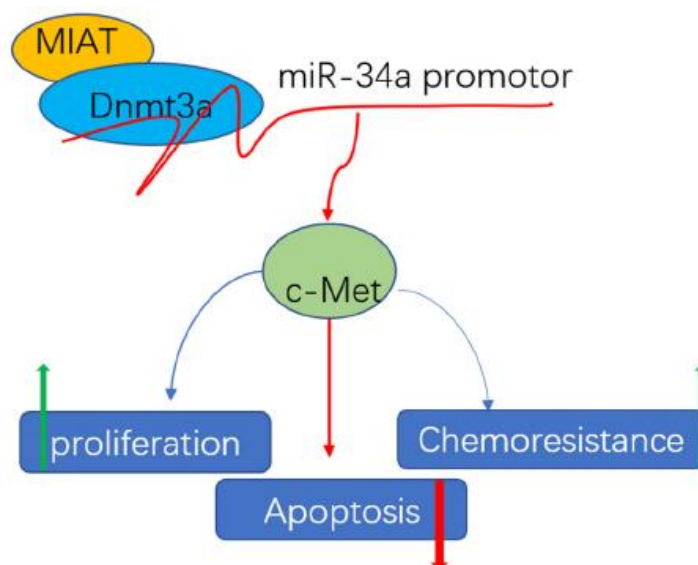
Nicméně MIAT je schopna regulovat buněčnou invazivitu buněk NSCLC rovněž prostřednictvím regulace exprese ZEB1 (*zinc finger E-box binding homeobox 1*) supresí miR-150, jejíž cílem je právě ZEB1 (Zhang *et al.*, 2017). Zhang *et al.* (2017) ukázali, že exprese ZEB1 je v tkáních NSCLC vyšší než v odpovídajících tkáních nenádorových a inhibicí ZEB1 lze docílit poklesu počtu invazivních buněk.

MIAT též obsahuje vazebné místo pro miR-133a-5p, jejíž míra exprese se v NSCLC po downregulaci MIAT zvýšila. Cílovými mRNA této miRNA jsou například myosin 1B nebo SGK1 (*serum/glucocorticoid regulated kinase 1*) (Zheng *et al.*, 2018). Myosin 1B se podílí například na tumorigenezi karcinomu děložního hrdla a jeho knockdown snižuje

proliferaci a migraci nádorových buněk a zároveň značně potlačuje aktivitu MMP-9 či MMP-1 (Zhang *et al.*, 2018). Nadměrná exprese SGK1 zase podporuje buněčnou proliferaci a migraci buněk kolorektálního karcinomu (Liang *et al.*, 2017). Přesná funkce myosinu 1B a SGK1 v NSCLC zatím není prozkoumaná, přesto lze očekávat jejich zapojení do progresu NSCLC.

Další studie potvrzuje zapojení lncRNA MIAT do vzniku rezistence vůči gefitinibu⁹ v buněčných liniích karcinomu plic (Fu *et al.*, 2018). Výsledky této studie ukazují, že míra exprese MIAT byla vyšší v buňkách rezistentních k gefitinibu ve srovnání s buňkami nerezistentními. Dále demonstrovali, že knockdown MIAT v buňkách karcinomu plic zesílil inhibiční účinky gefitinibu až tak, že současně inhiboval buněčnou proliferaci a podpořil apoptózu. Zároveň zjistili, že míra exprese MIAT negativně koreluje s mírou exprese miR-34a. Dalo by se očekávat, že MIAT tedy funguje jako ceRNA pro miR-34a, nicméně v této studii popisují jiný způsob, jakým MIAT reguluje její expresi. Podařilo se jim prokázat, že downregulací MIAT lze snížit hypermetylaci promotoru genu miR-34a. Navíc další

výsledky ukázaly, že MIAT interaguje s metyltransferázou Dnmt3a a rekrutuje ji do promotoru genu miR-34a, čímž ho hypermetyluje a snižuje tak expresi miR-34a. Jedním z cílů této miRNA je protein s tyrosin-kinázovou aktivitou c-Met (*c-mesenchymal-epithelial transition factor*). MIAT tedy podporuje vznik rezistence vůči gefitinibu zvýšením množství c-Met v buňkách



Obr. 9: Schéma vzniku rezistence buněk NSCLC vůči léku gefitinib působením MIAT (převzato z Fu *et al.*, 2018)

karcinomu plic inhibicí genové exprese miR-34a (Obr. 9).

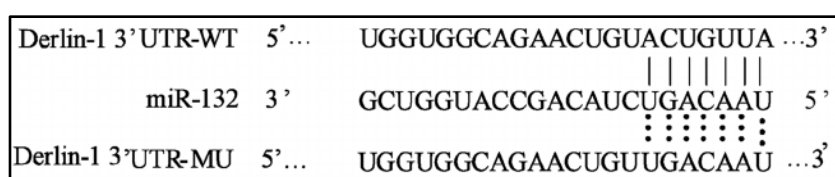
Jiná a velmi nedávná studie zase demonstrovala zapojení MIAT do rezistence buněk NSCLC vůči cisplatině, kdy downregulace MIAT umožnila zastavit růst nádoru a zvýšit citlivost nádorových buněk na cisplatinu (Wu *et al.*, 2020). Ovšem dále zjistili, že MIAT se opět chová jako ceRNA a reguluje expresi miR-184. Knockdown MIAT zapříčinil nadměrnou expresi miR-184 a současně downreguloval RNA-vazebný protein SF1. Tudíž MIAT

⁹ Gefitinib patří mezi inhibitory tyrosin kináz cílící na gen EGFR (EGFR-TKI) a užívá se také k léčbě NSCLC

podporuje buněčnou proliferaci a růst nádoru částečně prostřednictvím regulace exprese SF1 downregulací miR-184. Přesná funkce a mechanismus SF1 v NSCLC zatím nejsou známy, avšak některé dřívější studie prokázaly, že SF1 je schopen například zesílit tumorigenezi testikulárního germinálního nádoru (Zhu *et al.*, 2010).

3.3.6 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom (*colorectal cancer – CRC*) je nádorové onemocnění tlustého střeva a rektu. MIAT je v tkáních a buňkách CRC vysoce exprimována a její downregulací lze inhibovat buněčnou proliferaci, migraci a invazivitu a současně zvýšit apoptózu buněk CRC (Liu *et al.*, 2018). Ve stejné studii bylo dále prokázáno, že MIAT působí jako ceRNA



Obr. 10: Schéma vazby miR-132 a proteinu Derlin-1 (převzato z Liu *et al.*, 2018)

pro miR-132 a tudíž podporuje expresi membránového proteinu Derlin-1, který je cílem dané miRNA (Obr. 10).

Derlin-1 působí jako onkogen při podpoře růstu a tvorby metastáz CRC buněk, jelikož napomáhá jejich proliferaci (Tan *et al.*, 2015). MIAT se tedy do progresu CRC zapojuje prostřednictvím regulace osy miR-132/Derlin-1.

Zároveň analýza délky přežití ukázala, že celková míra přežití za tři roky po koletkomi byla významně nižší u pacientů s CRC, kteří měli vyšší hladinu MIAT (Li *et al.*, 2019).

3.3.7 Karcinom štítné žlázy

LncRNA MIAT se taktéž zapojuje do progresu papilárního karcinomu štítné žlázy (*papillary thyroid cancer – PTC*). V roce 2019 byly na toto téma publikovány dvě studie. Liu *et al.*, (2019) prokázali vyšší expresi MIAT v tkáních PTC a její umlčení vedlo k inhibici buněčné proliferace, invazivity a k narušení progresu buněčného cyklu buněk PTC. Další jejich výsledky ukazují, že MIAT funguje mechanismem kompetitivní endogenní RNA. Přímě se váže na miR-324-3p a tím upreguluje expresi proteinu LASP1 (*LIM and SH3 domain protein 1*), který je cílem této miRNA. Expresí mRNA LASP1 vykazovala pozitivní korelaci s expresí MIAT v PTC a navíc velké množství LASP1 v karcinomu štítné žlázy přispívá k silné buněčné proliferaci a migrační schopnosti buněk štítné žlázy a to zřejmě prostřednictvím aktivace dráhy PI3K/AKT (Gao and Han, 2017).

Jiná studie naopak ukázala, že MIAT podporuje buněčnou proliferaci, migraci a invazivitu buněk PTC prostřednictvím regulace miR-212 a downregulací MIAT lze potlačit

růst nádoru *in vivo* (Wang *et al.*, 2019). MiR-212 v karcinomu štítné žlázy funguje jako tumor-supresor, neboť jedním z jejích cílů je protein SIRT1 (Li *et al.*, 2018), který je schopen například potlačit senescenci a podpořit tumorigenezi v tkáních hepatocelulárního karcinomu (Zhao *et al.*, 2019).

3.3.8) Další typy nádorového onemocnění

Vyšší exprese MIAT je přítomna též u lymfoidních buněčných linií s fenotypem již maturovaných B-lymfocytů. Zvláště vysoká míra exprese MIAT byla pozorována u agresivní formy chronických lymfocytárních leukémií (CLL) (Sattari *et al.*, 2016). Dle této studie se MIAT podílí na progresi onemocnění CLL prostřednictvím vzájemné regulace s OCT4. MIAT představuje regulační smyčku pozitivní zpětné vazby s OCT4 a obě molekuly působí anti-apoptoticky v maligních maturovaných B-buňkách.

MIAT je vysoce exprimovaná i v karcinomu ledviny. Navíc vyšší míra exprese MIAT korelovala s horšími klinicko-patologickými prvky a kratší mírou přežití. MIAT se zde podílí na regulaci buněčné proliferace a vzniku metastáz. Současně bylo potvrzeno, že je MIAT schopna vázat miR-29c a tak pozitivně regulovat expresi *Loxl2* (*lysyl oxidase-like 2*) (Qu *et al.*, 2018). *Loxl2* napomáhá migraci, invazivitě a epitelo-mezenchymální tranzici buněk karcinomu ledviny (Hong and Yu, 2019).

Nelze opominout ani klíčovou roli MIAT v patogenezi neuroblastomu a glioblastomu. Bylo prokázáno, že knockdown MIAT snižuje dlouhodobé přežití buněk jak neuroblastomu, tak glioblastomu, dále podporuje basální apoptózu a zhoršuje schopnost buněk migrovat (Bountali *et al.*, 2019). Také byl nalezen vztah mezi amplifikací¹⁰ MIAT a NMYC v buněčných liniích neuroblastomu (NBL) a expresí MIAT ve vzorcích tkáně NBL. Amplifikace NMYC je u neuroblastomu známkou nejhorší prognózy. Tlumení MIAT indukuje apoptózu v buňkách s amplifikací NMYC, ale v buňkách NBL bez amplifikace NMYC pouze snižuje proliferaci. Umlčení MIAT snižuje expresi NMYC v NMYC-amplifikovaných NBL buňkách a expresi c-Myc v buňkách bez amplifikace. Kromě toho downregulace MIAT snížila expresi ornitin dekarboxylázy 1, což je cíl transkripce MYC onkogenů. Tyto výsledky ukazují, že MIAT je předřazeným regulátorem NMYC a že narušení osy MIAT/NMYC indukuje buněčnou smrt v NMYC-amplifikovaných NBL buňkách (Feriancikova *et al.*, 2021).

Zvýšená míra exprese MIAT je též pozorována v buňkách spinocelulárního karcinomu jazyka (*tongue squamous cell carcinoma – TSCC*). Analýza přežití ukázala, že velké množství

¹⁰ Větší množství kopií daného genu v buňce

MIAT v tkáních TSCC je provázeno vyšším stupěm mortality a kratší dobou přežití pacientů s TSCC. Zároveň bylo zjištěno, že upregulovaná MIAT podporuje invazivitu a epitelo-mezenchymální tranzici buněk TSCC prostřednictvím aktivace signální dráhy Wnt/ β -catenin (Zhong *et al.*, 2019).

Laryngeální spinocelulární karcinom (*laryngeal squamous cell carcinoma - LSCC*) je další nádorové onemocnění, jehož průběh MIAT reguluje. Nadměrná exprese MIAT předpovídá špatnou prognózu onemocnění a podporuje progresi LSCC. Umlčení MIAT vede k potlačení buněčné proliferace, migrace a invazivity buněk LSCC. MIAT zde opět funguje mechanismem ceRNA a inhibuje expresi miR-147a, čímž následně zvyšuje expresi BCOR a indukuje tumorigenezi (Song *et al.*, 2021).

MIAT má svou roli také v karcinomu děložního hrdla (*cervical cancer – CC*). V buňkách a tkáních CC vykazuje MIAT vyšší expresi ve srovnání s kontrolami a současně downregulace MIAT vede ke snížení buněčné proliferace, migrace a invazivity buněk CC a k potlačení nádorového růstu *in vivo*. Knockdown MIAT navíc zpříčinil nižší míru fosforylace PI3K, AKT a mTOR, čímž potlačil aktivaci signální dráhy PI3K/AKT. MIAT tedy podporuje tumorigenezi karcinomu děložního hrdla prostřednictvím aktivace dráhy PI3K/AKT v CC (Zhang *et al.*, 2020).

Vysokou expresi MIAT lze pozorovat taktéž v mnohočetném myelomu (*multiple myeloma – MM*). Knockdown MIAT inhiboval buněčný růst MM. Současně bylo prokázáno, že MIAT zvyšuje rezistenci buněk MM vůči protinádorovému léku bortezomib a to zřejmě negativní regulací miR-29b (Fu *et al.*, 2019).

3.4) Shrnutí a diskuze

LncRNA MIAT je součástí mnoha regulačních procesů, díky kterým se významně podílí na vzniku a progresi řady nádorů. Jak už bylo popsáno na předchozích stránkách, MIAT dokáže regulovat alternativní sestřih prostřednictvím interakce se sestřihovým faktorem SF1 (Tsuiji *et al.*, 2011) či ovlivňovat míru exprese některých miRNA a bránit jim tak v regulaci jejich cílů mechanismem kompetitivní endogenní RNA (ceRNA) (Yan *et al.*, 2015). Mechanismus ceRNA je pro MIAT klíčový k regulaci buněčných procesů v nádorových tkáních a buňkách. Ve většině případů nádorových onemocnění, které jsou asociovány s vysokou mírou exprese MIAT byla zjištěna zároveň negativní korelace exprese MIAT a miRNA. Tyto miRNA často působí jako tumor-supresory a jejich umlčením může dojít k nádorovému bujení, k podpoře buněčné proliferace a celkově k progresi nádorového

onemocnění. Seznam miRNA, které MIAT reguluje v jednotlivých nádorech lze nalézt v Tabulce 1. Současně jsou zde uvedeny cílové proteiny (či molekuly) daných miRNA.

Ovšem MIAT je také schopna se podílet na vývoji nádoru regulací genové exprese pomocí epigenetické změny. Interaguje například s modulátory histonů MLLs, čímž reguluje expresi MMP-9 v NSCLC (Lai *et al.*, 2017). Jiná studie zase uvádí, že je MIAT schopna interagovat s metyltransferázou Dnmt3a a rekrutovat ji do promotoru genu miR-34a (Fu *et al.*, 2018). Navíc MIAT prostřednictvím miRNA reguluje expresi proteinů HDAC4 a SIRT1, což jsou histon-deacetylázy a jejich vyšší exprese byla také asociována s nádorovým procesem (Lai *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2019).

MIAT	Nádor	Regulovaná miRNA	Regulovaný gen/protein
	Hepatocelulární karcinom (HCC)	miR-214	EZH2
			B-katenin
		miR-22-3p	SIRT1
	Karcinom žaludku (GC)	miR-29a-3p	HDAC4
		miR-141	TAZ
			DDX5
	Karcinom prsu (BC)	miR-302	Cyklin D1
		miR-155-5p	DUSP7
	Nádor vaječníku (EOC)	miR-330-5p	S100A7
		miR-150-5p	?
	Nádor plic (NSCLC)	miR-150	ZEB1
		miR-133a-5p	Myosin 1B
			SGK1
			Wnt9a
		miR-34a	c-Met
		miR-184	SF1
	Kolorektální karcinom (CRC)	miR-132	Derlin-1
	Karcinom štítné žlázy (PTC)	miR-324-3p	LASP1
		miR-212	SIRT1
	Karcinom ledviny	miR-29c	Loxl2
	Laryngeální spinocelulární karcinom (LSCS)	miR-147a	BCOR
	Mnohočetný myelom (MM)	miR-29b	?

Tabulka 1: Seznam miRNA regulované pomocí lncRNA MIAT v nádorech (vlastní zpracování)

Ačkoli je zřejmé, že lncRNA MIAT vykazuje jasné pronádorové vlastnosti, některé studie si vzájemně protirečí. Luan *et al.* (2017) ve své práci uvádí, že MIAT podporuje růst nádoru prsu upregulací proteinu DUSP7 (v tabulce 1 vyznačen červeně) prostřednictvím regulace miR-155-5p. Tvrdí tedy, že vysoká míra exprese DUSP7 výrazně přispívá k progresi nádorového onemocnění. Jiná studie naopak došla k závěru, že DUSP7 je v tkáních karcinomu prsu downregulován a celkově jeho nižší míra exprese je asociována s kratším přežitím pacientek BC (Peng *et al.*, 2017).

Podle další studie MIAT reguluje epitelo-mezenchymální tranzici, buněčný růst a invazivitu buněk karcinomu vaječníku negativní regulací miR-150-5p, která působí jako tumor-supresor (Zhou *et al.*, 2020). Jak se ale ukázalo, ne vždy tato miRNA vykazuje tumor-inhibující účinky. Výsledky jiné studie ukázaly, že upregulace miR-150-5p způsobuje progresi rekurentního karcinomu vaječníku regulací dráhy c-Myb/Slug a její inhibice může sloužit jako nová terapeutická strategie v prevenci recidivy¹¹ karcinomu vaječníku (Tung *et al.*, 2020).

Také již zmíněná studie (Zheng *et al.*, 2018) popisuje pozitivní korelaci exprese MIAT a proteinů myosin 1B, SGK1 a Wnt9a (v tabulce značen červeně). Zatímco proteiny myosin 1B a SGK1 působí pronádorově, protein Wnt9a naopak inhibuje buněčnou proliferaci (Xiang *et al.*, 2008) a částečně tedy kompenzuje jinak pronádorový účinek MIAT v NSCLC (Zheng *et al.*, 2018).

Nicméně těchto výjimek není mnoho a ve všech příkladech výše zmíněných knockdown MIAT vedl k potlačení vývoje nádorového onemocnění. Je patrné, že tato oblast výzkumu není zcela prozkoumaná, ale i přesto lze „vidět“ klíčovou roli MIAT v progresi některých nádorových onemocnění.

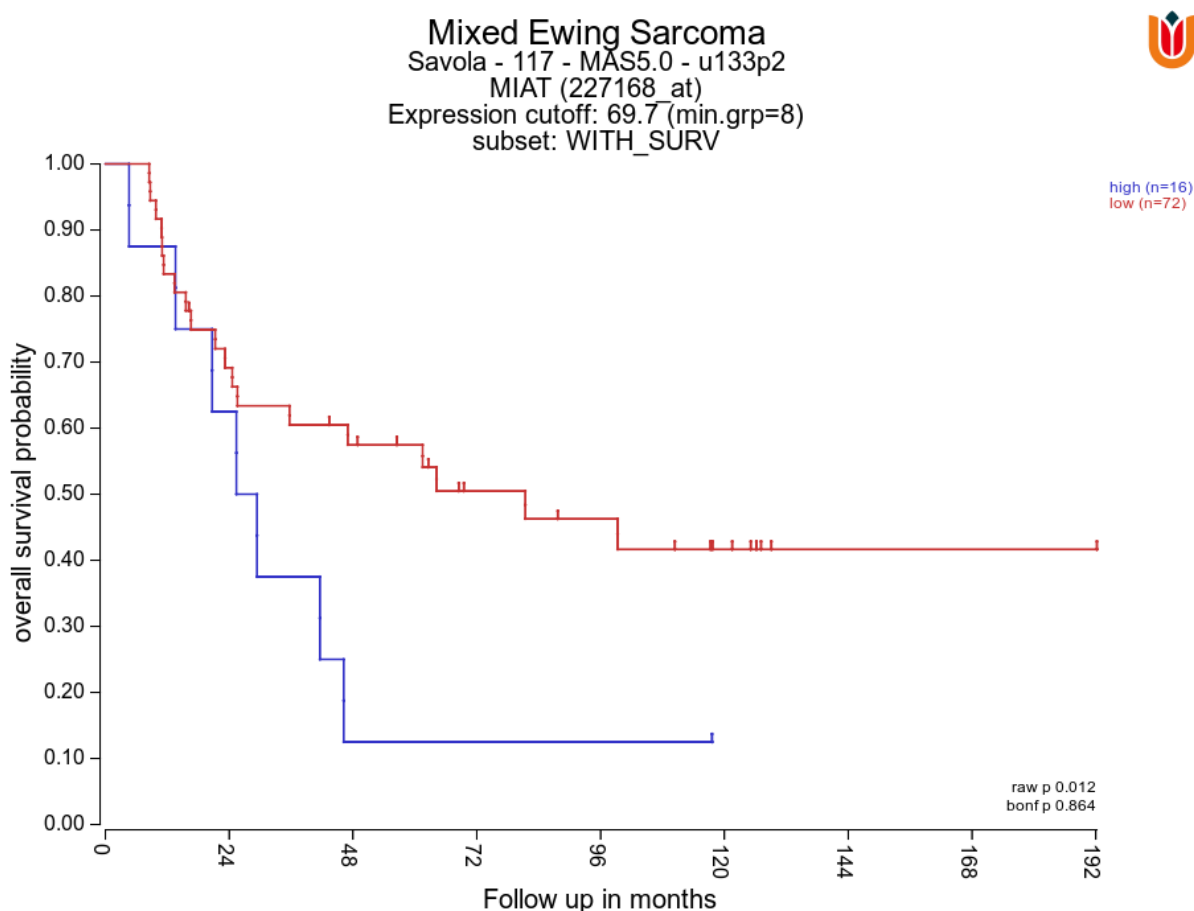
4) Stanovení exprese MIAT v buněčných liniích Ewingova sarkomu

Ewingův sarkom (EWS) je druhým nejčastějším kostním nádorem u dětí a adolescentů, ale vyskytuje se též u kojenců. Vyvíjí se v různých částech těla, nejčastěji však napadá axiální skelet. Histologicky je EWS složen z uniformních malých kulatých nádorových buněk s kulatými jádry a drobnou cytoplazmou. Je znám od roku 1921, kdy Ewing nazval tento „sarkom kulatých buněk“ v kosti 14leté dívky jako „difúzní endoteliom kosti“ (Ewing, 1921).

¹¹ Opětovný výskyt

V současné době standardní léčba EWS spočívá v systémové chemoterapii a lokální terapii, přičemž lokální terapie je nedůležitější částí léčby, kdy se provádí maximální možná chirurgická resekce či radioterapie nebo jejich kombinace.

O expresi MIAT u EWS dosud nebyly publikovány žádné informace. Analýza přežití pacientů s EWS, která byla provedena z veřejně přístupné databáze výsledků vyšetření vzorků EWS pomocí expresních čipů (Savola *et al.*, 2011; <http://r2platform.com/>), ukázala, že vyšší hladina exprese MIAT vede k nižšímu dožití pacientů (Graf 2), modrá křivka značí vysokou expresi MIAT a červená značí nízkou expresi. Na základě těchto poznatků byla stanovována míra exprese MIAT v nádorových buněčných liniích TC-32, TTC-466 a IARC a v kontrolní nenádorové buněčné linii lidských fibroblastů, HDFn.



29 samples lack survival data and will be omitted from the analysis

last survival modification: Fri Jul 11 17:18:18 2014. Survival Data Signature: a8612c2b4cead70f0074a2099f2ba5ed. Months with 2 digits.

Graf 2: Kaplan-Meierovy křivky přežití pacientů s Ewingovým sarkomem v závislosti na expresi MIAT (vygenerováno z práce Savola *et al.*, 2011 pomocí databáze dostupné na <http://r2platform.com/>)

4.1.) Materiál a chemikálie

Carl Roth (Německo): merkaptoetanol

Generi Biotech (ČR): *Generi Biotech Reverse Transcription Kit* kit pro reverzní transkripci, „Easy Master Mix“, primery a sondy (AssayqPCR hPOLR2A FAM, AssayqPCR hMIAT FAM)

Gibco (USA): sodno-fosfátový pufr s obsahem NaCl (PBS), telecí sérum (*fetalbovine serum*, FBS), *Roswell Park Memorial Institute* médium (RPMI)

Thermo Fisher Scientific (USA): Pure Link® RNA Mini Kit kit pro izolaci RNA

Buněčné linie EWS byly darem prof. Sue Burchill z Fakultní nemocnice St. James's University v Yorkshire v Anglii

4.2) Metody

Rozmrazení buněk, jejich kultivaci a přípravu vzorků buněčných extraktů pro následnou analýzu provedla Mgr. et Ing. Barbara Feriančíková.

4.2.1) Kultivace buněčných linií

Buněčné linie Ewingova sarkomu TC-32, TTC-466 a IARC byly kultivovány v RPMI médiu obohaceném o 10% telecí sérum (FBS). Kultivace probíhala v inkubátoru *Jouan IGO 150* (USA) při 37°C s 5% CO₂ a 95% vlhkostí vzduchu. Buněčné linie byly pravidelně pasážovány omytím PBS, uvolněním z povrchu kultivačních lahvíček 0,05% roztokem trypsinu a resuspendováním v dostatečném množství média.

4.2.2) Izolace RNA z analyzovaných buněk Ewingova sarkomu

K izolaci byl použit *PureLink® RNA Mini Kit* a bylo postupováno dle návodu výrobce. K buněčným peletám analyzovaných vzorků bylo přidáno 0,6 ml lyzačního pufru obohaceným o 1% 2-merkaptóetanol a vzniklé suspenze byly následně zvortexovány na vortexu *VELP Scientifica Rw3* (Itálie) až do „zlyzování“ buněčné pelety. Dále bylo ke každé suspenzi přidáno 0,6 ml 70% etanolu a suspenze byly zvortexovány. 700 µl takto upravených vzorků bylo postupně nanášeno na kolonku umístěnou v centrifugační zkumavce a centrifugováno v centrifuze *Eppendorf Centrifuge 5415R* (Německo) při 12 000 x g, 15 sekund, po centrifugaci byla z centrifugačních zkumavek vylita přebytečná tekutina a tento krok byl opakován do zpracování celého objemu každého vzorku. Následovalo promytí uchycené RNA na membráně kolonky umístěné v centrifugační zkumavce promývacím pufrem I (700 µl) a poté dvakrát promývacím pufrem II (500 µl), přičemž po nanesení každého objemu promývacího pufru na kolonku proběhla centrifugace a poté vylití přebytečné tekutiny z centrifugační zkumavky. Každá kolonka s uchycenou a promytou RNA byla přendána do sběrné zkumavky a na membránu každé kolonky bylo nepipetováno 30 µl vody bez RNas a inkubováno 1 minutu. Nakonec byly kolonky umístěné ve sběrných zkumavkách centrifugovány 2 minuty při 13 000 x g do uvolnění analyzované RNA

z membrány kolonky. Izolovaná RNA byla uchována ve sběrných zkumavkách pro další použití. Se vzorky bylo pracováno v laminárním boxu *Telstar AV-100* (Španělsko). Koncentrace izolované RNA byla změřena přístrojem *Nanodrop ND-1000* (USA) a její čistota, která se posuzovala na základě poměru absorbancí A260/A280, se pohybovala v rozmezí 1,8 – 2,3.

4.2.3) Reverzní transkripce RNA

Pro reverzní transkripci vyizolované RNA byl použit kit s inhibitorem RNas *Generi Biotech Reverse Transcription Kit*. Každý vzorek RNA byl naředěný vodou bez RNas do 10 µl tak, aby obsahoval 1000 ng RNA a k naředěným vzorkům bylo napipetováno 10 µl „Master Mixu“. Příprava vzorků pro reverzní transkripci byla prováděna v boxu *Bioair instruments Aura PCR* (Itálie). Pro samotnou reverzní transkripci RNA byl použit termocykler *SensoQuest Labcycler* (Německo), kde byl nastaven teplotní profil 42°C, 60 minut a poté 4°C ∞.

4.2.4) Kvantitativní polymerázová reakce v reálném čase (RT-qPCR) pro gen MIAT

Použité primery a sonda byly připravené v *Generi Biotech* (ČR) (hMIAT a kontrolní gen hPOLR2 s FAM (6-Carboxyfluorescein) značenými fluorescenčními specifickými sondami). V každé reakci bylo 10 µl „Easy Master Mixu“, 2 µl výše zmíněných primerů a sond, 7 µl vody bez RNas a nakonec 1 µl vzorku cDNA. Každý vzorek byl měřen v triplicátu pomocí *QuantStudio™ 3 and 5 Real-Time PCR Systems* (USA), kde byl programem *QuantStudio™ Design & Analysis Software* nastaven tento teplotní protokol:

95°C – 3 minuty

50 cyklů za těchto podmínek:

95°C – 10 sekund

65°C – 20 sekund

Výsledky byly vyhodnoceny použitím relativní kvantifikace, která popisuje relativní změnu exprese genu POLR2 (tzv. *house-keeping* gen). Výpočet exprese genu MIAT byl prováděn metodou $\Delta\Delta C_t$ a byl použit následující vztah:

$$R = 2^{(-\Delta\Delta C_t)}$$

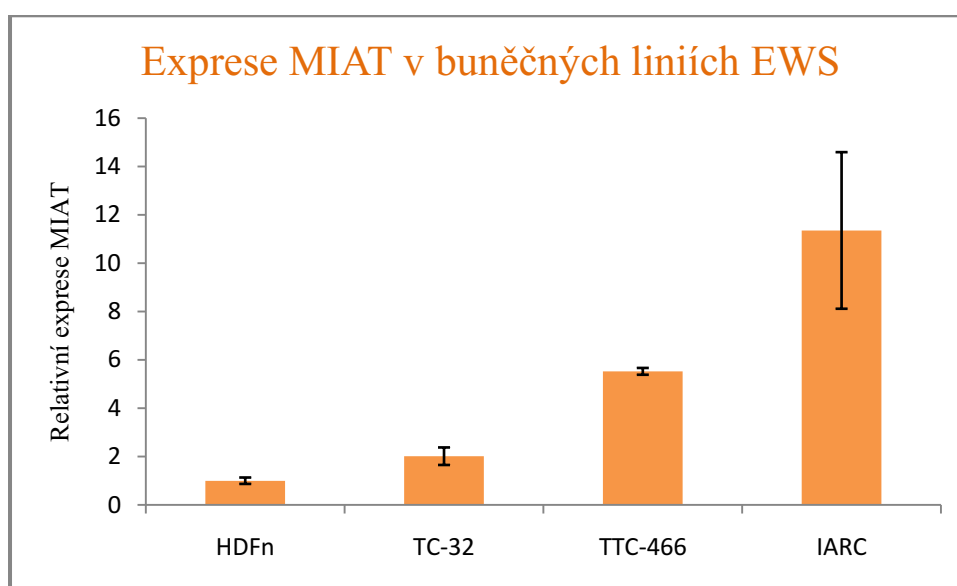
$$\text{kde } \Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{vzorku}} - \Delta C_{t\text{kontroly}} \text{ a } \Delta C_t = C_{t(\text{MIAT})} - C_{t(\text{POLR2})}$$

R z ang. ratio

C_t z ang. treshold

4.3) Výsledky

Buněčné linie Ewingova sarkomu TC-32, TTC-466 a IARC a nenádorová buněčná linie lidských fibroblastů HDFn byly kultivovány postupem uvedeným v kapitole 4.2.1 a následně byla z analyzovaných buněk izolována RNA (kapitola 4.2.2). Izolovaná RNA byla poté přepsána reverzní transkripcí do komplementární DNA (cDNA) s následnou polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase. Expresí MIAT je vztažena ke kontrolní nenádorové linii HDFn. Výsledky ukázaly, že ve všech třech nádorových liniích Ewingova sarkomu byla relativní exprese vyšší oproti nenádorové linii HDFn (Graf 3). Tyto pilotní údaje o expresi MIAT v buněčných liniích Ewingova sarkomu poslouží jako základ pro studium významu MIAT u tohoto nádoru.



Graf 3: Relativní exprese MIAT v EWS buněčných liniích TC-32, TTC-466 a IARC vztažena k nenádorové linii HDFn.

5) Závěr

Dlouhé nekódující RNA se ukázaly být kritickými regulátory řady buněčných procesů. LncRNA zprostředkovaná regulace pokrývá celou škálu mechanismů, kterými se lncRNA podílí například na umlčování genů, genomových lokusů či celých chromozomů nebo se naopak výrazně podílí na zvýšení exprese některých genů. Tyto procesy jsou velmi často regulované buď epigeneticky pomocí interakce s modulátory histonů anebo interagují přímo s transkripčními faktory. Některé lncRNA jsou rovněž schopny interagovat s pre-mRNA a ovlivňovat jejich *processing* nebo interagovat s proteiny a miRNA, kterým následně brání v další regulaci. Přestože většina z nich má důležité funkce, jejich nadměrná regulace často vede k buněčné proliferaci a nádorovému bujení.

Tato práce byla věnována především lncRNA MIAT, jejíž vysoká exprese je asociována s několika typy onemocnění včetně nádorového onemocnění. Jsou zde shrnuty důležité poznatky z dosavadních publikovaných prací. Ukázalo se, že knockdownem MIAT v tkáních mnoha typů nádorů lze docílit snížení buněčné proliferace, zmírnění migrace a invazivity buněk a zároveň podpořit senescenci či apoptózu *in vitro* a v několika případech se povedlo zmírnit nebo zastavit růst nádoru *in vivo*. Navíc bylo prokázáno, že se MIAT zapojuje do rezistence vůči některým chemoterapeutickým lékům, což je jednou z hlavních příčin selhání protinádorové léčby. Downregulací MIAT se v některých případech povedlo zesílit citlivost rezistentních nádorových buněk vůči těmto lékům a zlepšit tak výsledek protinádorové léčby.

Během práce bylo vypořádováno, že MIAT se podílí na progresi nádorového onemocnění nejčastěji mechanismem ceRNA. Navíc často dokáže v jednom typu nádoru regulovat více miRNA najednou a tím ovlivňovat mnoho buněčných procesů podporujících růst nádoru. Mimoto ale interaguje s některými modulátory histonů a je schopna epigeneticky ovlivňovat expresi onkogenů či tumor-supresorů. Tudíž, z hlediska efektivity se zdá mnohem účinnější ta metoda boje s nádory, která by cílila přímo na lncRNA MIAT oproti knockdownu jednotlivých proteinů a jiných „regulátorů“ podílejících se na tumorigenezi, které jsou většinou stejně regulované pomocí MIAT prostřednictvím daných miRNA.

Na základě Kaplan-Meierových křivek přežití pacientů s EWS v závislosti na expresi MIAT byla v této práci také stanovována relativní exprese genu MIAT ve třech buněčných liniích EWS (TC-32, TTC-466 a IARC), která byla vztažena k nenádorové linii HDFn. Výsledky ukázaly, že ve všech třech liniích EWS byla relativní míra exprese vyšší v porovnání s nenádorovou linií. Dá se tedy předpokládat, že je MIAT zapojena taktéž do patogeneze EWS, k čemuž je ale potřeba dalších výzkumů.

Jak již bylo avizováno, MIAT se jeví jako kritický regulátor patologických procesů v některých typech nádorového onemocnění. Lze ji využít také jako biomarker a urychlit tak diagnostiku nebo může posloužit jako terapeutický cíl. Nicméně pro její opravdové využití v protinádorové léčbě je potřeba mnohem více vědeckých poznatků. Až další výzkumy ukážou, zdali je MIAT tak důležitým terapeutickým cílem, jakým se zdá být dnes.

Literatura:

- Alipoor, F.J., Asadi, M.H., Torkzadeh-Mahani, M., 2018. MIAT lncRNA is overexpressed in breast cancer and its inhibition triggers senescence and G1 arrest in MCF7 cell line. *J. Cell. Biochem.* 119, 6470–6481. <https://doi.org/10.1002/jcb.26678>
- Almnaseer, Z.A., Mourtada-Maarabouni, M., 2018. Long noncoding RNA MIAT regulates apoptosis and the apoptotic response to chemotherapeutic agents in breast cancer cell lines. *Biosci. Rep.* 38, BSR20180704. <https://doi.org/10.1042/BSR20180704>
- Apra, J., Prenninger, S., Dori, M., Ghosh, T., Monasor, L.S., Wessendorf, E., Zocher, S., Massalini, S., Alexopoulou, D., Lesche, M., Dahl, A., Groszer, M., Hiller, M., Calegari, F., 2013. Transcriptome sequencing during mouse brain development identifies long non-coding RNAs functionally involved in neurogenic commitment: LncRNAs control neurogenesis. *EMBO J.* 32, 3145–3160. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.245>
- Aznaourova, M., Schmerer, N., Schmeck, B., Schulte, L.N., 2020. Disease-Causing Mutations and Rearrangements in Long Non-coding RNA Gene Loci. *Front. Genet.* 11, 527484. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.527484>
- Barry, G., Briggs, J.A., Vanichkina, D.P., Poth, E.M., Beveridge, N.J., Ratnu, V.S., Nayler, S.P., Nones, K., Hu, J., Bredy, T.W., Nakagawa, S., Rigo, F., Taft, R.J., Cairns, M.J., Blackshaw, S., Wolvetang, E.J., Mattick, J.S., 2014. The long non-coding RNA Gomafu is acutely regulated in response to neuronal activation and involved in schizophrenia-associated alternative splicing. *Mol. Psychiatry* 19, 486–494. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.45>
- Berglund, J.A., Chua, K., Abovich, N., Reed, R., Rosbash, M., 1997. The Splicing Factor BBP Interacts Specifically with the Pre-mRNA Branchpoint Sequence UACUAAC. *Cell* 89, 781–787. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80261-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80261-5)
- Bountali, A., Tonge, D.P., Mourtada-Maarabouni, M., 2019. RNA sequencing reveals a key role for the long non-coding RNA MIAT in regulating neuroblastoma and glioblastoma cell fate. *Int. J. Biol. Macromol.* 130, 878–891. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.005>
- Brunner, A.L., Beck, A.H., Edris, B., Sweeney, R.T., Zhu, S.X., Li, R., Montgomery, K., Varma, S., Gilks, T., Guo, X., Foley, J.W., Witten, D.M., Giacomini, C.P., Flynn, R.A., Pollack, J.R., Tibshirani, R., Chang, H.Y., van de Rijn, M., West, R.B., 2012. Transcriptional profiling of long non-coding RNAs and novel transcribed regions across a diverse panel of archived human cancers. *Genome Biol.* 13, R75. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-8-r75>
- Calin, G.A., Liu, C., Ferracin, M., Hyslop, T., Spizzo, R., Sevignani, C., Fabbri, M., Cimmino, A., Lee, E.J., Wojcik, S.E., Shimizu, M., Tili, E., Rossi, S., Taccioli, C., Pichiorri, F., Liu, X., Zupo, S., Herlea, V., Gramantieri, L., Lanza, G., Alder, H., Rassenti, L., Volinia, S., Schmittgen, T.D., Kipps, T.J., Negrini, M., Croce, C.M., 2007. Ultraconserved Regions Encoding ncRNAs Are Altered in Human Leukemias and Carcinomas. *Cancer Cell* 12, 215–229. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.027>
- *Crea, F., Venalainen, E., Ci, X., Cheng, H., Pikor, L., Parolia, A., Xue, H., Nur Saidy, N.R., Lin, D., Lam, W., Collins, C., Wang, Y., 2016. The role of epigenetics and long noncoding RNA MIAT in neuroendocrine prostate cancer. *Epigenomics* 8, 721–731. <https://doi.org/10.2217/epi.16.6>
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D.G., Lagarde, J., Veeravalli, L., Ruan, X., Ruan, Y., Lassmann, T., Carninci, P., Brown, J.B., Lipovich, L., Gonzalez, J.M., Thomas, M., Davis, C.A., Shiekhata, R., Gingeras, T.R., Hubbard, T.J., Notredame, C., Harrow, J., Guigo, R., 2012. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* 22, 1775–1789. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>
- Dey, K.K., Bharti, R., Dey, G., Pal, I., Rajesh, Y., Chavan, S., Das, S., Das, C.K., Jena, B.C., Halder, P., Ray, J.G., Kulavi, I., Mandal, M., 2016. S100A7 has an oncogenic role in oral

- squamous cell carcinoma by activating p38/MAPK and RAB2A signaling pathway. *Cancer Gene Ther.* 23, 382–391. <https://doi.org/10.1038/cgt.2016.43>
- Djebali, S., Davis, C.A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., Xue, C., Marinov, G.K., Khatun, J., Williams, B.A., Zaleski, C., Rozowsky, J., Röder, M., Kokocinski, F., Abdelhamid, R.F., Alioto, T., Antoshechkin, I., Baer, M.T., Bar, N.S., Batut, P., Bell, K., Bell, I., Chakraborty, S., Chen, X., Chrast, J., Curado, J., Derrien, T., Drenkow, J., Dumais, E., Dumais, J., Duttagupta, R., Falconnet, E., Fastuca, M., Fejes-Toth, K., Ferreira, P., Foissac, S., Fullwood, M.J., Gao, H., Gonzalez, D., Gordon, A., Gunawardena, H., Howald, C., Jha, S., Johnson, R., Kapranov, P., King, B., Kingswood, C., Luo, O.J., Park, E., Persaud, K., Preall, J.B., Ribeca, P., Risk, B., Robyr, D., Sammeth, M., Schaffer, L., See, L.-H., Shahab, A., Skancke, J., Suzuki, A.M., Takahashi, H., Tilgner, H., Trout, D., Walters, N., Wang, H., Wrobel, J., Yu, Y., Ruan, X., Hayashizaki, Y., Harrow, J., Gerstein, M., Hubbard, T., Reymond, A., Antonarakis, S.E., Hannon, G., Giddings, M.C., Ruan, Y., Wold, B., Carninci, P., Guigó, R., Gingeras, T.R., 2012. Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489, 101–108. <https://doi.org/10.1038/nature11233>
- Du, C., Li, D., Li, N., Chen, L., Li, S., Yang, Y., Hou, M., Xie, M., Zheng, Z., 2017. DDX5 promotes gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo through mTOR signaling pathway. *Sci. Rep.* 7, 42876. <https://doi.org/10.1038/srep42876>
- Engreitz, J.M., Haines, J.E., Perez, E.M., Munson, G., Chen, J., Kane, M., McDonel, P.E., Guttman, M., Lander, E.S., 2016. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. *Nature* 539, 452–455. <https://doi.org/10.1038/nature20149>
- Engreitz, J.M., Sirokman, K., McDonel, P., Shishkin, A.A., Surka, C., Russell, P., Grossman, S.R., Chow, A.Y., Guttman, M., Lander, E.S., 2014. RNA-RNA Interactions Enable Specific Targeting of Noncoding RNAs to Nascent Pre-mRNAs and Chromatin Sites. *Cell* 159, 188–199. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.018>
- Ewing, J., 1921. Diffuse endothelioma of bone. *Proc N Y Pathol Soc* 21, 17–24.
- Fagerberg, L., Hallström, B.M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpour, S., Danielsson, A., Edlund, K., Asplund, A., Sjöstedt, E., Lundberg, E., Szigartyo, C.A.-K., Skogs, M., Takanen, J.O., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Lindskog, C., Danielsson, F., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Zwahlen, M., Olsson, I., Navani, S., Huss, M., Nielsen, J., Ponten, F., Uhlén, M., 2014. Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 13, 397–406. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>
- Feriancikova, B., Feglarova, T., Krskova, L., Eckschlager, T., Vicha, A., Hrabeta, J., 2021. MIAT Is an Upstream Regulator of NMYC and the Disruption of the MIAT/NMYC Axis Induces Cell Death in NMYC Amplified Neuroblastoma Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3393. <https://doi.org/10.3390/ijms22073393>
- Fu, Y., Li, C., Luo, Y., Li, L., Liu, J., Gui, R., 2018. Silencing of Long Non-coding RNA MIAT Sensitizes Lung Cancer Cells to Gefitinib by Epigenetically Regulating miR-34a. *Front. Pharmacol.* 9, 82. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00082>
- Fu, Y., Liu, X., Zhang, F., Jiang, S., Liu, J., Luo, Y., 2019. Bortezomib-inducible long non-coding RNA myocardial infarction associated transcript is an oncogene in multiple myeloma that suppresses miR-29b. *Cell Death Dis.* 10, 319. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1551-z>
- Gao, W., Han, J., 2017. Silencing of LIM and SH3 Protein 1 (LASP-1) Inhibits Thyroid Cancer Cell Proliferation and Invasion. *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin. Cancer Ther.* 25, 879–886. <https://doi.org/10.3727/096504016X14785415155643>
- Ge, L., Li, D.-S., Chen, F., Feng, J.-D., Li, B., Wang, T.-J., 2017. TAZ overexpression is associated with epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-resistant gastric cancer cells. *Int. J. Oncol.* 51, 307–315. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3998>

- Hong, X., Yu, J., 2019. Silencing of lysyl oxidase-like 2 inhibits the migration, invasion and epithelial-to-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells through the Src/FAK signaling pathway. *Int. J. Oncol.* 54, 1676–1690. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4726>
- Hou, A., Zhang, Y., Zheng, Y., Fan, Y., Liu, H., Zhou, X., 2019. LncRNA terminal differentiation-induced ncRNA (TINCR) sponges miR-302 to upregulate cyclin D1 in cervical squamous cell carcinoma (CSCC). *Hum. Cell* 32, 515–521. <https://doi.org/10.1007/s13577-019-00268-y>
- Huang, X., Gao, Y., Qin, J., Lu, S., 2018. lncRNA MIAT promotes proliferation and invasion of HCC cells via sponging miR-214. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 314, G559–G565. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00242.2017>
- Ishii, N., Ozaki, K., Sato, H., Mizuno, H., Susumu Saito, Takahashi, A., Miyamoto, Y., Ikegawa, S., Kamatani, N., Hori, M., Satoshi Saito, Nakamura, Y., Tanaka, T., 2006. Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction. *J. Hum. Genet.* 51, 1087–1099. <https://doi.org/10.1007/s10038-006-0070-9>
- Ji, P., Diederichs, S., Wang, W., Böing, S., Metzger, R., Schneider, P.M., Tidow, N., Brandt, B., Buerger, H., Bulk, E., Thomas, M., Berdel, W.E., Serve, H., Müller-Tidow, C., 2003. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin β 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* 22, 8031–8041. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206928>
- Jin, S.-J., Jin, M.-Z., Xia, B.-R., Jin, W.-L., 2019. Long Non-coding RNA DANCR as an Emerging Therapeutic Target in Human Cancers. *Front. Oncol.* 9, 1225. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01225>
- Klinck, R., Bramard, A., Inkel, L., Dufresne-Martin, G., Gervais-Bird, J., Madden, R., Paquet, É.R., Koh, C., Venables, J.P., Prinos, P., Jilaveanu-Pelms, M., Wellinger, R., Rancourt, C., Chabot, B., Abou Elela, S., 2008. Multiple Alternative Splicing Markers for Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 68, 657–663. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2580>
- Lai, I.-L., Yang, C.-A., Lin, P.-C., Chan, W.-L., Lee, Y.-T., Yen, J.-C., Chang, Y.-S., Chang, J.-G., 2017. Long noncoding RNA MIAT promotes non-small cell lung cancer proliferation and metastasis through MMP9 activation. *Oncotarget* 8, 98148–98162. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21465>
- Langford, C.J., Klinz, F.-J., Donath, C., Gallwitz, D., 1984. Point mutations identify the conserved, intron-contained TACTAAC box as an essential splicing signal sequence in yeast. *Cell* 36, 645–653. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90344-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90344-1)
- Latos, P.A., Pauler, F.M., Koerner, M.V., Senergin, H.B., Hudson, Q.J., Stocsits, R.R., Allhoff, W., Stricker, S.H., Klement, R.M., Warczok, K.E., Aumayr, K., Pasierbek, P., Barlow, D.P., 2012. Airn Transcriptional Overlap, But Not Its lncRNA Products, Induces Imprinted Igf2r Silencing. *Science* 338, 1469–1472. <https://doi.org/10.1126/science.1228110>
- Lee, S., Kopp, F., Chang, T.-C., Sataluri, A., Chen, B., Sivakumar, S., Yu, H., Xie, Y., Mendell, J.T., 2016. Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins. *Cell* 164, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.017>
- Li, C., Tang, T., Wang, W., 2019. Effect of LncRNA MIAT on Prognosis of Hand-assisted Laparoscopic or Laparoscopic-assisted Colectomy for Colorectal Cancer. *Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Tech.* 29, 456–461. <https://doi.org/10.1097/SLE.0000000000000728>
- Li, D., Bai, L., Wang, T., Xie, Q., Chen, M., Fu, Y., Wen, Q., 2018. Function of miR-212 as a tumor suppressor in thyroid cancer by targeting SIRT1. *Oncol. Rep.* 39, 695–702. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6119>
- Li, Y., Wang, K., Wei, Y., Yao, Q., Zhang, Q., Qu, H., Zhu, G., 2017. lncRNA-MIAT regulates cell biological behaviors in gastric cancer through a mechanism involving the miR-29a-3p/HDAC4 axis. *Oncol. Rep.* 38, 3465–3472. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6020>

- Liang, X., Lan, C., Jiao, G., Fu, W., Long, X., An, Y., Wang, K., Zhou, J., Chen, T., Li, Y., Xu, J., Huang, Q., Xu, B., Xiao, J., 2017. Therapeutic inhibition of SGK1 suppresses colorectal cancer. *Exp. Mol. Med.* 49, e399–e399. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.184>
- Lin, M., Xia, B., Qin, L., Chen, H., Lou, G., 2018. S100A7 Regulates Ovarian Cancer Cell Metastasis and Chemoresistance Through MAPK Signaling and Is Targeted by miR-330-5p. *DNA Cell Biol.* 37, 491–500. <https://doi.org/10.1089/dna.2017.3953>
- Liu, W., Wang, Z., Wang, C., Ai, Z., 2019. Long non-coding RNA MIAT promotes papillary thyroid cancer progression through upregulating LASP1. *Cancer Cell Int.* 19, 194. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0913-z>
- Liu, Z., Wang, H., Cai, H., Hong, Y., Li, Y., Su, D., Fan, Z., 2018. Long non-coding RNA MIAT promotes growth and metastasis of colorectal cancer cells through regulation of miR-132/Derlin-1 pathway. *Cancer Cell Int.* 18, 59. <https://doi.org/10.1186/s12935-017-0477-8>
- Luan, T., Zhang, X., Wang, S., Song, Y., Zhou, S., Lin, J., An, W., Yuan, W., Yang, Y., Cai, H., Zhang, Q., Wang, L., 2017. Long non-coding RNA MIAT promotes breast cancer progression and functions as ceRNA to regulate DUSP7 expression by sponging miR-155-5p. *Oncotarget* 8, 76153–76164. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19190>
- Luo, J., Yao, J.-F., Deng, X.-F., Zheng, X.-D., Jia, M., Wang, Y.-Q., Huang, Y., Zhu, J.-H., 2018. 14, 15-EET induces breast cancer cell EMT and cisplatin resistance by up-regulating integrin $\alpha\beta 3$ and activating FAK/PI3K/AKT signaling. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 37, 23. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0694-6>
- *Matějka, V.M., Finek, J., Králíčková, M., 2017. Epithelial-mesenchymal Transition in Tumor Tissue and Its Role for Metastatic Spread of Cancer. *Klin. Onkol.* 30, 20–27. <https://doi.org/10.14735/amko201720>
- Mitra, R., Chen, X., Greenawalt, E.J., Maulik, U., Jiang, W., Zhao, Z., Eischen, C.M., 2017. Decoding critical long non-coding RNA in ovarian cancer epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat. Commun.* 8, 1604. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01781-0>
- Mottet, D., Pirotte, S., Lamour, V., Hagedorn, M., Javerzat, S., Bikfalvi, A., Bellahcène, A., Verdin, E., Castronovo, V., 2009. HDAC4 represses p21WAF1/Cip1 expression in human cancer cells through a Sp1-dependent, p53-independent mechanism. *Oncogene* 28, 243–256. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.371>
- Peng, W., Huang, J., Yang, L., Gong, A., Mo, Y.-Y., 2017. Linc-RoR promotes MAPK/ERK signaling and confers estrogen-independent growth of breast cancer. *Mol. Cancer* 16, 161. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0727-3>
- Penny, G.D., Kay, G.F., Sheardown, S.A., Rastan, S., Brockdorff, N., 1996. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* 379, 131–137. <https://doi.org/10.1038/379131a0>
- Portoso, M., Ragazzini, R., Brenčić, Ž., Moiani, A., Michaud, A., Vassilev, I., Wassef, M., Servant, N., Sargueil, B., Margueron, R., 2017. PRC2 is dispensable for HOTAIR-mediated transcriptional repression. *EMBO J.* 36, 981–994. <https://doi.org/10.15252/emboj.201695335>
- Qi, Z., Li, T., Kong, F., Li, Y., Wang, R., Wang, J., Xiao, Q., Zhang, W., Sun, S., He, D., Xiao, X., 2015. The Characteristics and Function of S100A7 Induction in Squamous Cell Carcinoma: Heterogeneity, Promotion of Cell Proliferation and Suppression of Differentiation. *PLOS ONE* 10, e0128887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128887>
- Qu, Y., Xiao, H., Xiao, W., Xiong, Z., Hu, W., Gao, Y., Ru, Z., Wang, C., Bao, L., Wang, K., Ruan, H., Song, Z., Chen, K., Zhang, X., Yang, H., 2018. Upregulation of MIAT Regulates LOXL2 Expression by Competitively Binding MiR-29c in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell. Physiol. Biochem.* 48, 1075–1087. <https://doi.org/10.1159/000491974>
- Ramos-DeSimone, N., Hahn-Dantona, E., Siple, J., Nagase, H., French, D.L., Quigley, J.P., 1999. Activation of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) via a Converging Plasmin/Stromelysin-1 Cascade Enhances Tumor Cell Invasion. *J. Biol. Chem.* 274, 13066–13076. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.19.13066>

- Rapicavoli, N.A., Poth, E.M., Blackshaw, S., 2010. The long noncoding RNA RNCR2 directs mouse retinal cell specification. *BMC Dev. Biol.* 10, 49. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-49>
- Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Xu, X., Brugmann, S.A., Goodnough, L.H., Helms, J.A., Farnham, P.J., Segal, E., Chang, H.Y., 2007. Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell* 129, 1311–1323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.022>
- Sattari, A., Siddiqui, H., Moshiri, F., Ngankeu, A., Nakamura, T., Kipps, T.J., Croce, C.M., 2016. Upregulation of long noncoding RNA MIAT in aggressive form of chronic lymphocytic leukemias. *Oncotarget* 7, 54174–54182. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11099>
- Savola, S., Klami, A., Myllykangas, S., Manara, C., Scotlandi, K., Picci, P., Knuutila, S., Vakkila, J., 2011. High Expression of Complement Component 5 (C5) at Tumor Site Associates with Superior Survival in Ewing's Sarcoma Family of Tumour Patients. *ISRN Oncol.* 2011, 168712. <https://doi.org/10.5402/2011/168712>
- Sha, M., Lin, M., Wang, J., Ye, J., Xu, J., Xu, N., Huang, J., 2018. Long non-coding RNA MIAT promotes gastric cancer growth and metastasis through regulation of miR-141/DDX5 pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 37, 58. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0725-3>
- Shao, S., Tian, J., Zhang, H., Wang, S., 2018. LncRNA myocardial infarction-associated transcript promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis by targeting miR-330-5p in epithelial ovarian cancer cells. *Arch. Med. Sci.* 14, 1263–1270. <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.75535>
- Sone, M., Hayashi, T., Tarui, H., Agata, K., Takeichi, M., Nakagawa, S., 2007. The mRNA-like noncoding RNA Gomafu constitutes a novel nuclear domain in a subset of neurons. *J. Cell Sci.* 120, 2498–2506. <https://doi.org/10.1242/jcs.009357>
- Song, D., Wu, S., Hu, H., Dai, X., Wang, X., 2021. Long Noncoding RNA MIAT Regulates the Process of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Through Regulation of miR-147a/BCOR. *Arch. Med. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.12.001>
- Spadaro, P.A., Flavell, C.R., Widagdo, J., Ratnu, V.S., Troup, M., Ragan, C., Mattick, J.S., Bredy, T.W., 2015. Long Noncoding RNA-Directed Epigenetic Regulation of Gene Expression Is Associated With Anxiety-like Behavior in Mice. *Biol. Psychiatry* 78, 848–859. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.02.004>
- Tan, X., He, X., Jiang, Z., Wang, Xiaohong, Ma, L., Liu, L., Wang, Xiang, Fan, Z., Su, D., 2015. Derlin-1 is overexpressed in human colon cancer and promotes cancer cell proliferation. *Mol. Cell. Biochem.* 408, 205–213. <https://doi.org/10.1007/s11010-015-2496-x>
- Tripathi, V., Ellis, J.D., Shen, Z., Song, D.Y., Pan, Q., Watt, A.T., Freier, S.M., Bennett, C.F., Sharma, A., Bubulya, P.A., Blencowe, B.J., Prasanth, S.G., Prasanth, K.V., 2010. The Nuclear-Retained Noncoding RNA MALAT1 Regulates Alternative Splicing by Modulating SR Splicing Factor Phosphorylation. *Mol. Cell* 39, 925–938. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.011>
- Tsai, M.-C., Manor, O., Wan, Y., Mosammaparast, N., Wang, J.K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., Chang, H.Y., 2010. Long Noncoding RNA as Modular Scaffold of Histone Modification Complexes. *Science* 329, 689–693. <https://doi.org/10.1126/science.1192002>
- Tsuiji, H., Yoshimoto, R., Hasegawa, Y., Furuno, M., Yoshida, M., Nakagawa, S., 2011. Competition between a noncoding exon and introns: Gomafu contains tandem UACUAAC repeats and associates with splicing factor-1: Competition between exons and introns. *Genes Cells* 16, 479–490. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01502.x>
- Tung, C.-H., Kuo, L.-W., Huang, M.-F., Wu, Y.-Y., Tsai, Y.-T., Wu, J.-E., Hsu, K.-F., Chen, Y.-L., Hong, T.-M., 2020. MicroRNA-150-5p promotes cell motility by inhibiting c-Myb-mediated Slug suppression and is a prognostic biomarker for recurrent ovarian cancer. *Oncogene* 39, 862–876. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1025-x>
- *Ulitsky, I., Bartel, D.P., 2013. lincRNAs: Genomics, Evolution, and Mechanisms. *Cell* 154, 26–46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.020>

- Vausort, M., Wagner, D.R., Devaux, Y., 2014. Long Noncoding RNAs in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circ. Res.* 115, 668–677. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303836>
- Vinod, B.S., Antony, J., Nair, H.H., Puliyappadamba, V.T., Saikia, M., Shyam Narayanan, S., Bevin, A., John Anto, R., 2013. Mechanistic evaluation of the signaling events regulating curcumin-mediated chemosensitization of breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Cell Death Dis.* 4, e505–e505. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.26>
- Wang, R., Zhao, L., Ji, L., Bai, L., Wen, Q., 2019. Myocardial infarction associated transcript (MIAT) promotes papillary thyroid cancer progression via sponging miR-212. *Biomed. Pharmacother.* 118, 109298. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109298>
- Wang, Y.-D., Cai, N., Wu, X.-L., Cao, H.-Z., Xie, L.-L., Zheng, P.-S., 2013. OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death Dis.* 4, e760–e760. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.272>
- Wu, L., Liu, C., Zhang, Z., 2020. Knockdown of lncRNA MIAT inhibits proliferation and cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells by increasing miR-184 expression. *Oncol. Lett.* 19, 533–541. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.11084>
- Xia, H., Ooi, L.L.P.J., Hui, K.M., 2012. MiR-214 Targets β -Catenin Pathway to Suppress Invasion, Stem-Like Traits and Recurrence of Human Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* 7, e44206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044206>
- Xiang, Y., Lin, G., Zhang, Q., Tan, Y., Lu, G., 2008. Knocking down Wnt9a mRNA levels increases cellular proliferation. *Mol. Biol. Rep.* 35, 73–79. <https://doi.org/10.1007/s11033-007-9055-9>
- Yan, B., Yao, J., Liu, J.-Y., Li, X.-M., Wang, X.-Q., Li, Y.-J., Tao, Z.-F., Song, Y.-C., Chen, Q., Jiang, Q., 2015. lncRNA-MIAT Regulates Microvascular Dysfunction by Functioning as a Competing Endogenous RNA. *Circ. Res.* 116, 1143–1156. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305510>
- Yang, Y., Chang, S., Zhao, Z., Hou, N., He, K., Wang, X., Gao, L., Wang, L., Cai, D., Guo, B., Tong, D., Song, T., Huang, C., 2015. MicroRNA-214 suppresses the proliferation of human hepatocellular carcinoma cells by targeting E2F3. *Oncol. Lett.* 10, 3779–3784. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3745>
- Yao, X., Tu, Y., Xu, Y., Guo, Y., Yao, F., Zhang, X., 2020. Endoplasmic reticulum stress confers 5-fluorouracil resistance in breast cancer cell via the GRP78/OCT4/lncRNA MIAT/AKT pathway. *Am. J. Cancer Res.* 10, 838–855.
- Yu, J., Feng, Y., Wang, Y., An, R., 2018. Aryl hydrocarbon receptor enhances the expression of miR-150-5p to suppress in prostate cancer progression by regulating MAP3K12. *Arch. Biochem. Biophys.* 654, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.07.010>
- Zhang, H.-R., Lai, S.-Y., Huang, L.-J., Zhang, Z.-F., Liu, J., Zheng, S.-R., Ding, K., Bai, X., Zhou, J.-Y., 2018. Myosin 1b promotes cell proliferation, migration, and invasion in cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 149, 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.01.024>
- Zhang, H.-Y., Zheng, F.-S., Yang, W., Lu, J.-B., 2017. The long non-coding RNA MIAT regulates zinc finger E-box binding homeobox 1 expression by sponging miR-150 and promoting cell invasion in non-small-cell lung cancer. *Gene* 633, 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.08.009>
- Zhang, L., Ge, S., Cao, B., 2020. Long non-coding RNA MIAT promotes cervical cancer proliferation and migration. *J. Biochem. (Tokyo)* 168, 183–190. <https://doi.org/10.1093/jb/mvaa037>
- Zhao, J., Sun, B.K., Erwin, J.A., Song, J.-J., Lee, J.T., 2008. Polycomb Proteins Targeted by a Short Repeat RNA to the Mouse X Chromosome. *Science* 322, 750–756. <https://doi.org/10.1126/science.1163045>

- Zhao, L., Hu, K., Cao, J., Wang, P., Li, J., Zeng, K., He, X., Tu, P.-F., Tong, T., Han, L., 2019. lncRNA miat functions as a ceRNA to upregulate sirt1 by sponging miR-22-3p in HCC cellular senescence. *Aging* 11, 7098–7122. <https://doi.org/10.18632/aging.102240>
- Zheng, C., Li, X., Qian, B., Feng, N., Gao, S., Zhao, Y., Zhou, B., 2018. The lncRNA myocardial infarction associated transcript-centric competing endogenous RNA network in non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag. Res.* 10, 1155–1162. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S163395>
- Zhong, W., Xu, Z., Wen, S., Xie, T., Wang, F., Wang, Q., Chen, J., 2019. Long non-coding RNA myocardial infarction associated transcript promotes epithelial-mesenchymal transition and is an independent risk factor for poor prognosis of tongue squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 48, 720–727. <https://doi.org/10.1111/jop.12892>
- Zhou, S., Xu, A., Song, T., Gao, F., Sun, H., Kong, X., 2020. lncRNA MIAT Regulates Cell Growth, Migration, and Invasion Through Sponging miR-150-5p in Ovarian Cancer. *Cancer Biother. Radiopharm.* 35, 650–660. <https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3259>
- Zhu, R., Heaney, J., Nadeau, J.H., Ali, S., Martin, A., 2010. Deficiency of Splicing Factor 1 Suppresses the Occurrence of Testicular Germ Cell Tumors. *Cancer Res.* 70, 7264–7272. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0820>
- Zuo, Q.-F., Zhang, R., Li, B.-S., Zhao, Y.-L., Zhuang, Y., Yu, T., Gong, L., Li, S., Xiao, B., Zou, Q.-M., 2015. MicroRNA-141 inhibits tumor growth and metastasis in gastric cancer by directly targeting transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ. *Cell Death Dis.* 6, e1623–e1623. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.573>